

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA



Caracterización clínica y molecular de la
enfermedad de Stargardt y formas asociadas:
Aplicación de nuevas técnicas moleculares.

Jana Aguirre Lambán

Tesis Doctoral
Madrid, 2009

Instituto de Salud Carlos III (Referencia PI06/0027)



La Doctora Carmen Ayuso García, Jefa Asociada del Departamento de Genética de la Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada: Caracterización clínica y molecular de la enfermedad de Stargardt y formas asociadas: Aplicación de nuevas técnicas moleculares que presenta Dña. Jana Aguirre Lambán para obtener el Grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección, autorizándola para su presentación al Tribunal Calificador.

Madrid, a 8 de Septiembre de 2009.

V B

Fdo. Dra. Carmen Ayuso García
Directora de la Tesis Doctoral

Fdo. Prof. Dr. José Fernández Piqueras
Tutor de la Tesis Doctoral

Fundación Jiménez Díaz

Avda. de los Reyes Católicos, 2 -28040 Madrid – España

Tel. +34 91 550 48 00 Fax. +34 91 544 36 25 fjd@fjd.es www.fjd.es

A mi Madre
Por su apoyo incondicional...
Te mereces todo!!

A mis amig@s

Por estar siempre ahí...

Por hacerme feliz!!

Agradecimientos

Fue hace mucho tiempo, allá por Noviembre de 2004, cuando pise por primera vez el laboratorio de Genética. Recuerdo que venía con muchísima ilusión, sentimiento que no he perdido en todo este tiempo y todo gracias a todas aquellas personas que sin saberlo me han ayudado y aguantado durante este largo camino, a todas y cada una de ellas, GRACIAS!!.

En primer lugar, quisiera agradecer a las Doctoras Carmen Ayuso y Carmen Ramos la oportunidad que me brindaron hace cinco años de pertenecer a un grupo tan especial. Gracias por vuestro apoyo y por todos los innumerables consejos que me habéis ido dando.

De manera especial, quisiera agradecer a mi directora de Tesis, la Doctora Carmen Ayuso, su dirección, su confianza, su apoyo y paciencia que ha tenido con su becaria “riojana y algo cabezota”, porque gracias a su enorme y excelente trayectoria investigadora debo mi formación tanto académica como profesional. Gracias por inculcarnos que lo más importante son las personas.

Al Prof. Dr. José Fernández Piqueras, por ser mi tutor de Tesis, por recibirme tan amablemente en su despacho cada vez que lo necesitaba.

Al Prof. Dr. Juan José González Aguilera por su disponibilidad y amabilidad y por su enorme ayuda en el mundo tan complicado de la estadística.

Agradecerles, de forma especial, a todos los pacientes su paciencia y su colaboración cada vez que era necesaria. Sin vosotros este trabajo no hubiera sido posible.

A mis queridísimos “compis del labo” porque sin duda sois vosotros los que más me habéis apoyado y ayudado en un sin fin de ocasiones y por eso y por todo os quiero dar las gracias!!.

En primer lugar a Rosa, a mi hermana mayor, es a ti a quien debo gran parte de esta tesis, no me cansare de darte las gracias porque en ti encontré a una “compi” y a una amiga maravillosa que ha estado conmigo en todo momento, que me ha apoyado y aconsejado y me quito todas las tonterías de la cabeza al pensar, en los inicios de este camino, que no iba a ser capaz de hacer una tesis. Fue una gran suerte “heredar” el Stargardt que tantas satisfacciones nos ha dado. Mil gracias, mi niña!!!

A Mariajo, por compartir todos tus conocimientos, por tu entusiasmo, por tu comprensión, por escucharme en los malos momentos y también en los buenos, por tu alegría, gracias y no cambies nunca porque eres una persona especial de las que hace falta en la vida.

A mi querida Cris, ¿qué decirte?, pues que tienes un párrafo para ti sola porque te lo mereces!, porque has estado en todo momento, sobre todo en los malos, y ya sabemos a que momentos me refiero, que es cuando más se necesita a los amigos, pero hemos ido aprendiendo que todo se supera con una comidita en el momento adecuado. Gracias por ayudarme y confiar en mí!

A mi querida Aurori, por todos los buenos momentos que he pasado en secretaría, por apoyarme y escucharme, por no dejar nunca que me hundiese en el lodo, pero sobre todo por considerarme tu amiga fuera de estas paredes. Gracias por todo!

A mi querida Tere, porque ahora se el apoyo que me brindaste desinteresadamente en mis inicios cada vez que venias a hablar conmigo y a preguntarme simplemente ¿qué tal?. Gracias de verdad!

A María, por ser también como una hermana mayor, por tu apoyo en estos meses, por darme tu punto de vista, por escucharme cuando lloriqueaba y las fuerzas flaqueaban pero sobre todo por transmitirme tu energía y tu entusiasmo. Gracias por tu confianza!

A Jesús!!, porque eres genial, porque me has hecho reír, porque me has sabido tratar en los días que venia cruzada, porque es imposible discutir contigo, por escucharme y apoyarme, por ayudarme, por ser mi mecánico particular, porque se que en el fondo, aunque muy en el fono aprecias a esta logroñesa como ella te apreciaba a ti. "Lo conseguí!". Gracias, gracias y gracias!

A Diego, por tu apoyo en todo momento, por los innumerables consejos que me has ido dando a lo largo de estos años, por darme tu visión objetiva de los hechos, por tu ayuda con las figuras, artículos...se que te sientes orgulloso sabiendo que cada día me gusta menos Windows y mas el mundo del Mac. Que alivio!. Gracias de corazón!

A Mónica, por ser una becaria estupenda y cabezota donde las haya, ¿por qué será que nos entendimos a la primera?. Por tu entusiasmo y tus ganas de aprender pero sobre todo por esas cañitas que nos tomamos cuando las cosas no van como uno espera. Gracias por esos momentos!

A Belén, por confiar en mí, por compartir tan buenos momentos, por esas salidas nocturnas y ese gran viaje, por esas coincidencias de la vida, y por las decisiones difíciles. Gracias Belenchu!

A Eva, mi churri!!, esa "chur" que tiene una gracia y un salero que no se puede aguantar. Gracias por escucharme cada vez que necesitaba desahogarme, por ofrecer tu ayuda cada vez que me veías agobiada, por entenderme. Eres una persona muy especial a la cual tengo mucho cariño, vales un montón!. Gracias por tus ánimos y por tu alegría cada día!!

A Miguel, por apoyarme en los inicios, por todos los buenos momentos, porque lo que he ido aprendiendo en estos años es a quedarme con lo bueno y olvidar todo lo malo. Gracias!.

A Berta, porque aunque lleves poco tiempo te has convertido en un gran apoyo para mí, gracias por confiar en mí tanto en temas relacionados con el laboratorio como en otros más personales. Gracias por tus ánimos desde el primer momento y por esas terapias!.

Al labo pequeño, a Almu, gracias por tu gran apoyo en estos meses y por el grato recuerdo que tengo del congreso de Viena, lo pase genial!!, a Anita, por tus buenos consejos, Chony, Camilo, y a los que ya no están, Elena y Dan, gracias por vuestro apoyo en los momentos menos buenos y por vuestros consejos.

A citogenética, a Rocío, por escucharme, apoyarme y animarme cada día que me veías con mala cara, a Isa, Marta y Fernando por vuestros sabios consejos a tener en cuenta en todo momento. De nuevo quisiera agradecer a la Doctora Carmen Ramos su cercanía y su sabiduría. A Eddy por tu simpatía y saber estar.

A Carmen Laura, por esos buenos momentos que pasamos, esas idas de olla cada tarde, vaya risas!!. Gracias por hacerme ver la vida con humor!. A Nuri, por tus consejos, siempre “das en el clavo”!!. A Chema, por tu movimiento de pierna! jeje, es broma. Por tu interés. Por contar conmigo a la hora de tomar café. Por tus ánimos. A Ruth, por tu disponibilidad y ayuda cada vez que la he necesitado y tus buenos consejos. Ah! y por tu calidad! jeje. A Fiona, por tu comprensión y tus ánimos. A Pilar y Elena, por ser unas secretarías estupendas.

También quiero agradecerles su apoyo a mis tres alumnos favoritos, os intente enseñar lo mejor que pude. A Susanita, mi gran amiga, viniste por ¿seis meses?.. y te quedaste como ¿un año?, fue un gran año para mí, en ti encontré un enorme apoyo, me escuchabas, me aconsejabas, me ayudabas, fue una gran suerte poder trabajar contigo, pues el dHPLC nunca hubiera sido lo mismo!jeje..Te sigo echando mucho de menos pero tengo la gran suerte que puedo contar contigo siempre! Gracias por tantas cosas!. A Inés, las tres marías!!, fue genial coincidir las tres!, ese dHPLC que echaba humo!jeje, gracias por tus consejos, por tu apoyo y tus ánimos desde Vigo. A Dani, fue poco tiempo pero dio para mucho y aún de vez en cuando te doy la lata, gracias por tus consejos tanto científicos como personales y por tu apoyo desde la UAM.

A los compis de Neuro, Rosa, Raúl y en especial a Carmen, conocida mundialmente como Piluca pequeña, gracias por venir cada día y preguntarme como estaba. Ha sido un placer compartir tan buenos momentos con vosotros. Gracias por vuestros consejos!!.

A los compis de Reuma, en especial a Miriam, gracias por vuestras sonrisas cada vez que nos cruzamos por el pasillo. A Paola, del labo del final del pasillo, por esos cursos de doctorado en los que coincidimos.

A Esther, porque fue poco el tiempo que compartiste con nosotros pero muy intenso y dio, da y espero que de para mucho. Porque en ti he encontrado una gran amiga en la que se, puedo confiar. Gracias por escucharme y animarme en los malos momentos!.

Ahora toca el turno a todas aquellas personas ajenas al laboratorio que han estado siempre que las he necesitado. En especial, a mi queridísima María, mi tata, como ya escribiste, primero Logroño, siguió Zaragoza y después Madrid, son muchos y muy buenos los momentos que a lo largo de más de diez años de amistad hemos vivido. He echado mucho de menos el quedar contigo en el puente del faro de Moncloa para contarnos nuestras cosillas y tomarnos esas cañitas o ir de tienditas cada tarde, pero desde Logroño has estado apoyándome, aconsejándome, animándome cada día que lo he necesitado. Gracias por estar ahí y por ser mi gran amiga!. Tu amistad dio paso a conocer a: tu hermana, Laura gracias por estar siempre que lo he necesitado, por tu apoyo desde Logroño, por tus llamadas en los momentos importantes, por las terapias. Son también muchos los años de amistad. Es un placer saber que cuento con vuestro apoyo!!, tu “gentucilla” del labo, a Inés, Andrea y Elisa... unas grandes personas!, Oscar y su amigo Miguel porque se que me apreciáis.

A Miguel, por muchas cosas, por las risas, por las discusiones, por tu apoyo cuando empecé, por esas conversaciones, por escucharme, entenderme y animarme, pero sobre todo y después de todo por seguir siendo amigos.

A Diana, por tus charlas cada noche (cuando el trabajo lo permitía) en el pisillo de Cuatro Caminos. A Bernie, por tus consejos, por dejarme que me queje, por hacerme rabiar.

A mis amigas de toda la vida que me habéis apoyado siempre, son veinticinco años juntas, se dice pronto!!. Tengo tantos recuerdos..., unos buenos, otros malos pero siempre intentamos resolver nuestras diferencias y eso es lo que nos hace estar juntas y seguir siendo unas gallináceas!. María, Elena, Carolina y Triki, desde Logroño me habéis dado la fuerza que necesitaba, cada vez que iba me recibíais con los brazos abiertos, apoyándome y animándome. Gracias!!. A Laura y Sheila por estar aquí, es genial pensar que os tengo cerca y que puedo contar con vosotras. En especial a Shei, por un año de convivencia, por escucharme. Gracias a todas, os quiero!!. Espero que estemos juntas, por lo menos, otros veinticinco años más!!. A Gloria y Belén por esos maravillosos viajes que hacemos todos los veranos, es genial desconectar del día a día de esa manera. A Reyes por tu simpatía y un poco locura. Gracias por vuestro interés y por saber cómo me va todo cada vez que nos vemos. Y a todas aquellas personas que aunque no las nombre, me han apoyado.

A mi familia, tíos Pilar y Fede, Coral y José, Carmen y Emilio, Concha y Manolo por vuestro interés en cómo va todo. A mis primos, Daniel y Millán. A mi prima Mariana, porque es una tranquilidad tenerte cerca, a Antonio y sobre todo a Carlota porque la quiero ver crecer. A mi tía Laura, a Nieves y María Jesús, por dejarme un hueco en casa durante más de un año.

En especial, quiero dedicar esta Tesis a mi madre porque sin tu sacrificio no hubiera podido llegar hasta aquí. Lo has dado todo por mí, eres la persona más luchadora que conozco y lo has hecho genial. Gracias por todo tu apoyo, por dejarme tomar decisiones, por darme todas las oportunidades, por tus consejos, por entenderme, por escucharme, porque aunque no este contigo te siento muy cerca. Espero que estés muy orgullosa de mí porque yo lo estoy de ti. Gracias mami!!! porque eres la mejor madre que se puede tener. Te quiero mucho!!. Y por último, a mis dos ángeles porque me dan fuerza.

A tod@s, gracias por hacer todo más fácil.

Índice

| | |
|---|-----------|
| I- INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1- El ojo humano | 1 |
| 1.1- Desarrollo embrionario del ojo | 1 |
| 1.2- Funciones del ojo | 3 |
| 1.3- Estructura del ojo | 3 |
| 1.3.1- La retina | 5 |
| 1.3.1.1- Estructura macroscópica | 6 |
| 1.3.1.2- Estructura microscópica | 7 |
| 1.3.1.3- El proceso de fototransducción | 14 |
| 1.4- Funcionamiento del ojo | 17 |
| 2- La genética humana | 18 |
| 3- Enfermedades raras de origen genético | 20 |
| 4- Retinopatías hereditarias | 21 |
| 4.1- Introducción | 21 |
| 4.2- Heterogeneidad de las retinopatías hereditarias | 22 |
| 4.2.1- Heterogeneidad clínica | 22 |
| 4.2.2- Heterogeneidad genética | 24 |
| 4.2.3- Heterogeneidad en el patrón de herencia | 25 |
| 5- Retinopatías hereditarias centrales: Distrofias maculares | 28 |
| 6- Diagnóstico oftalmológico | 28 |
| 6.1- Antecedentes personales y familiares | 29 |
| 6.2- Exploración oftalmológica | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 7- Enfermedad de Stargardt..... | 32 |
| 7.1- Rasgos clínicos | 33 |
| 7.2- La proteína: ABCA4/RmP | 34 |
| 7.3- El gen: <i>ABCA4</i> | 37 |
| 7.4- Variantes alélicas de <i>ABCA4</i> | 37 |
| 7.4.1- Fenotipos asociados a <i>ABCA4</i> | 39 |
| 8- Aproximaciones Terapéuticas | 41 |
| 8.1- Terapia génica | 41 |
| 8.2- Tecnología de células encapsuladas | 42 |
| 8.3- Remodelación de la retina en modelos animales | 42 |
| 8.4- Retina artificial | 43 |
| 8.5- Células madre | 44 |
| II- OBJETIVOS | 45 |
| III- PACIENTES Y MÉTODOS | 47 |
| 1- Pacientes y familias estudiadas | 47 |
| 1.1- Procedencia de los pacientes | 47 |
| 1.2- Evaluación clínica | 47 |
| 1.3- Clasificación clínica de las familias estudiadas | 47 |
| 2- Metodología..... | 72 |
| 2.1- Obtención de ADN genómico | 72 |
| 2.1.1- Extracción de ADN genómico | 72 |
| 2.1.1.1- Extracción de ADN por el método salino..... | 72 |
| 2.1.1.2- Extracción automática de ADN | 72 |
| 2.1.2- Cuantificación del ADN | 73 |
| 2.2- Estudio genético directo..... | 75 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.1- Cribado de mutaciones mediante microarray de genotipado | 76 |
| 2.2.2- Reacción en cadena de la polimerasa: PCR | 76 |
| 2.2.2.1- Condiciones de la PCR | 77 |
| 2.2.2.2- Cebadores en la reacción de amplificación..... | 77 |
| 2.2.3- Purificación del producto de PCR | 79 |
| 2.2.3.1- Purificación a partir del producto de PCR | 82 |
| 2.2.3.2- Purificación a partir de gel de agarosa..... | 80 |
| 2.2.3.2.1- Purificación manual | 82 |
| 2.2.3.2.2- Purificación automática | 83 |
| 2.2.4- Secuenciación automática | 83 |
| 2.2.4.1- Reacción de secuenciación..... | 83 |
| 2.2.4.2- Purificación del producto secuenciado..... | 84 |
| 2.2.5- Técnica de dHPLC (<i>denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>) | 86 |
| 2.2.6- Técnica de HRM (<i>High Resolution Melting</i>)..... | 90 |
| 2.2.7- Técnica de MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>) | 94 |
| 2.2.8- Análisis con enzimas de restricción | 96 |
| 2.3- Estudio genético indirecto..... | 98 |
| 2.3.1- Reacción en cadena de la polimerasa: PCR | 98 |
| 2.3.1.1- Condiciones de la PCR | 98 |
| 2.3.1.2- Cebadores en la reacción de amplificación..... | 99 |
| 2.3.2- Análisis de haplotipos | 100 |
| 2.3.3- Diseño de árboles genealógicos | 100 |
| 2.4- Análisis de marcadores intragénicos | 101 |
| 2.5- Herramientas bioinformáticas | 101 |

IV- RESULTADOS.....102

1- Gen ABCA4102

| | |
|------------------------------------|-----|
| 1.1- Estudio Genético directo..... | 102 |
|------------------------------------|-----|

| | |
|--|-----|
| 1.1.1- Familias estudiadas | 102 |
| 1.1.2- Técnica de microarray de genotipado (ABCR-Asperbio)..... | 102 |
| 1.1.2.1- Determinación de sensibilidad y especificidad del microarray de genotipado | 115 |
| 1.1.3- Técnica de dHPLC | 117 |
| 1.1.4- Técnica de HRM | 126 |
| 1.1.5- Técnica de MLPA..... | 137 |
| 1.2- Estudio Genético indirecto | 142 |
| 1.2.1- Familias estudiadas | 142 |
| 1.2.2- Análisis de haplotipos | 142 |
| 1.3- Análisis de marcadores intragénicos | 154 |
| 1.4- Correlación genotipo-fenotipo..... | 163 |

V- DISCUSIÓN170

1- Discusión general170

2- Gen ABCA4171

| | |
|---|-----|
| 2.1- Estudio genético directo. Comparación de metodologías | 171 |
| 2.1.1- Microarray de genotipado (ABCR-Asperbio) | 172 |
| 2.1.1.1- Aplicación del microarray de genotipado en la enfermedad de Stargardt | 173 |
| 2.1.1.2- Aplicación del microarray de genotipado en la distrofia de conos y bastones autosómica recesiva | 175 |
| 2.1.1.3- Aplicación del microarray de genotipado en la retinosis pigmentaria autosómica recesiva | 176 |
| 2.1.2- Aplicación de la técnica de dHPLC | 178 |
| 2.1.3- Aplicación de la técnica de HRM | 179 |
| 2.1.4- Aplicación de la técnica de MLPA..... | 181 |
| 2.2- Estudio genético indirecto..... | 183 |
| 2.2.1- Enfermedad de Stargardt..... | 183 |

| | |
|---|------------|
| 2.2.2- Distrofia de conos y bastones autosómica recesiva | 184 |
| 2.2.3- Retinosis pigmentaria autosómica recesiva..... | 184 |
| 2.2.4- Análisis de marcadores intragénicos | 185 |
| 3- Implicación en la Enfermedad de Stargardt y fenotipos asociados | 188 |
| 4- Correlación genotipo-fenotipo | 189 |
| 5- Diseño de un algoritmo diagnóstico..... | 194 |
| VI- CONCLUSIONES | 195 |
| VII- BIBLIOGRAFÍA | 197 |
| VIII-PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS | |
| DOCTORAL | 216 |
| IX- ANEXOS | |
| 1- Anexo I: Comunicaciones a congreso tipo póster | |
| 2- Anexo II: Consentimiento informado pacientes | |

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1- EL OJO HUMANO

El ojo o globo ocular es el órgano que detecta la luz, siendo la base del sentido de la vista. Se compone de un sistema sensible a los cambios de luz, capaz de transformar éstos en impulsos eléctricos.

En la mayoría de los vertebrados, el ojo funciona proyectando imágenes a una retina sensible a la luz, donde se detecta y se transmite la señal correspondiente a través del nervio óptico. El ojo es aproximadamente esférico, lleno de una sustancia transparente gelatinosa llamada humor vítreo que rellena el espacio comprendido entre la retina y el cristalino cuya función es la de controlar el estado óptimo de la presión intraocular, y el humor acuoso, que se encuentra situado en el espacio existente entre el cristalino y la córnea, con una lente de enfoque llamada cristalino y un músculo llamado iris que regula cuánta luz entra y sale del ojo. El ojo y sus partes son esenciales para la existencia humana porque gracias a ellas captamos y percibimos las imágenes.

1.1- DESARROLLO EMBRIONARIO DEL OJO

El ojo humano es un órgano de gran sofisticación y complejidad. Comienza a formarse durante el desarrollo embrionario. En la tercera semana comienza un proceso denominado gastrulación, en el cual tiene lugar la formación de las tres capas fundamentales del embrión:

- Ectodermo: la capa más externa de células que rodea al embrión.
- Mesodermo: capa de células entre ectodermo y endodermo.
- Endodermo: es la capa de células más interna.

En el segundo mes del desarrollo embrionario se produce la formación de tejidos y órganos, proceso conocido como organogénesis. Del ectodermo se derivan los órganos y estructuras más externos, como la piel, pelo y uñas; la parte más exterior de los sistemas digestivo y respiratorio (boca y epitelio de la cavidad nasal); las células de la cresta neural (melanocitos, sistema nervioso periférico, dientes, cartílago); y el sistema nervioso central (cerebro, médula espinal, retina y nervios motores). El mesodermo se divide en varios subtipos encargados de la formación de diferentes estructuras como la formación del tubo neural, el músculo, el esqueleto, el aparato excretor. El endodermo dará lugar al epitelio de revestimiento de los tractos respiratorio y gastrointestinal.

La primera manifestación del desarrollo del globo ocular comienza a los veintidós días, en forma de dos surcos poco profundos a cada lado del cerebro anterior (Figura 1.1.1). Al cerrarse el tubo neural, los surcos producen evaginaciones del cerebro anterior, formándose las llamadas vesículas ópticas (Figura 1.1.2). A medida que estas vesículas se desarrollan, sus extremos distales se expanden y se constriñen, dando lugar a los tallos ópticos. Posterior a esto, las vesículas se ponen en contacto con el ectodermo superficial e inducen los cambios para la formación del cristalino. En este momento, en los tallos ópticos se desarrollan unos surcos denominados fisura óptica, de cuyo mesénquima se forman los vasos sanguíneos hialoideos. A medida que se acercan y se fusionan los bordes de la fisura, los vasos hialoideos quedan encerrados dentro del nervio óptico y darán lugar a la arteria y a la vena central de la retina. Poco después la vesícula óptica comienza a invaginarse, formando la cúpula óptica de pared doble. Las capas interna y externa de esta cúpula se encuentran separadas por el espacio intrarretiniano, pero poco después desaparece y las dos capas se yuxtaponen. A lo largo del desarrollo, la capa más externa se diferencia para formar el epitelio

pigmentario de la retina (EPR), mientras que las células de la capa más interna se dividen repetidamente para dar lugar a la retina (Figura 1.1.3).

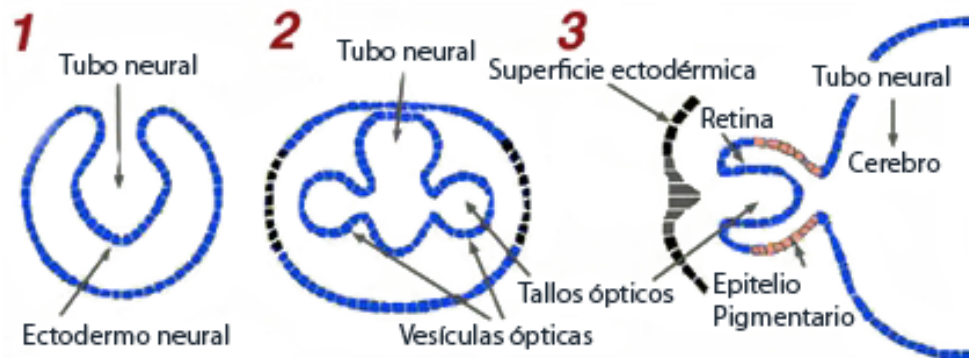


Figura 1.1. Esquema del desarrollo embrionario del globo ocular.

1.2- FUNCIONES DEL OJO

El ojo recibe los estímulos de los rayos de luz procedentes del entorno y los transforma en impulsos nerviosos. Estos impulsos llegan hasta el centro cerebral de la visión, donde se descodifican y se convierten en imágenes. La vista es una de las funciones neurosensoriales que nos permiten relacionarnos con el medio exterior y desenvolvernos en él.

1.3- ESTRUCTURA DEL OJO

El ojo humano es un complicado órgano que nos permite ver. Para entenderlo, debemos primero entender su anatomía.

Se diferencian varias estructuras externas:

La pupila es una abertura que permite a la luz pasar al interior del ojo. La pupila está controlada por el iris, un músculo coloreado circular, formado por una fina red de fibras conjuntivas, provista de numerosos vasos

sanguíneos y de los músculos que controlan la dilatación y la contracción de la pupila y además, es responsable del color de los ojos. El iris está cubierto por la córnea, una membrana transparente y resistente que carece de vasos sanguíneos. Se trata de la primera lente y la más potente del sistema óptico que permite el paso de la luz a las porciones interiores y que protege al iris y al cristalino. El cristalino es un componente con forma de lente situado tras el iris. Su función consiste en permitir enfocar objetos situados a diferentes distancias. Este objetivo se consigue mediante un aumento de su curvatura y de su espesor, proceso que se denomina *acomodación*. El cristalino se caracteriza por su alta concentración en proteínas, que le confieren un índice de refracción más elevado que los fluidos que lo rodean. Este hecho es el que le otorga su capacidad para refractar la luz, ayudando a la córnea a formar las imágenes sobre la retina (Figura 1.2).

En una sección sagital podemos diferenciar tres capas diferentes:

- La capa externa, compuesta por la esclerótica, una membrana de color blanco, gruesa, resistente y rica en fibras de colágeno. Su función es la de dar forma al globo ocular y proteger a los elementos más internos.
- La capa intermedia, dividida en dos partes:
 - anterior: contiene el iris y el cuerpo ciliar;
 - posterior: contiene la coroides o capa vascular.
- La capa interna o parte sensorial del ojo, la retina. En ella se encuentran las células sensibles a la luz: los conos y los bastones.

Existen tres cámaras rellenas de fluidos:

- cámara anterior, limitada por el iris y la córnea;
- cámara posterior, entre el iris y el cristalino; por ambas cámaras fluye un líquido claro, el humor acuoso, que humedece el cristalino y garantiza su nutrición.

- cámara vítrea, situada entre el cristalino y la retina; rellena de otro líquido, el llamado humor vítreo, que mantiene la tensión del interior del ojo.

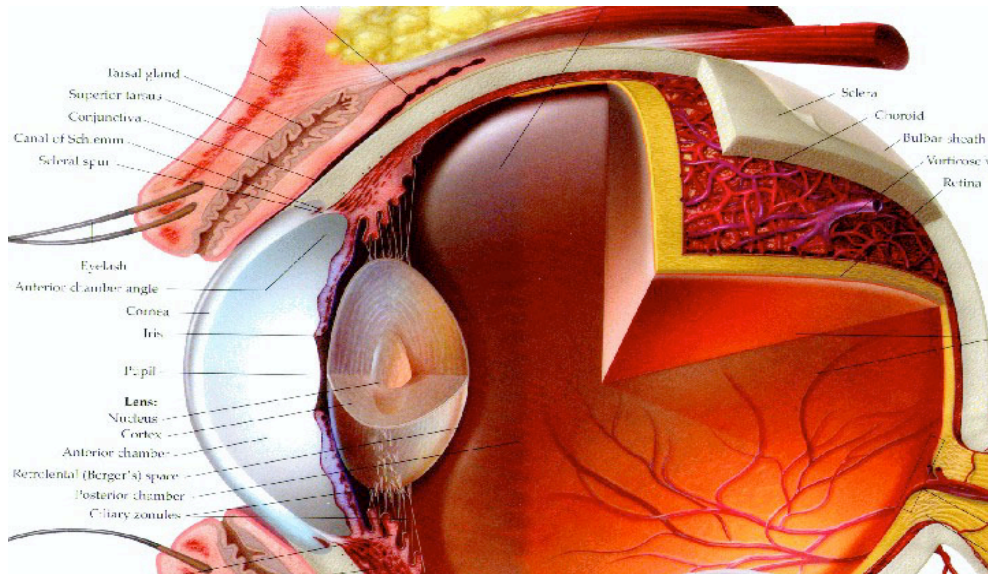


Figura 1.2. Anatomía externa e interna del globo ocular (www.eyedesignbook.com).

1.3.1- LA RETINA

La retina es la capa más interna de las tres capas del globo ocular (Weisz & Keogh, 1987) y es el tejido fotorreceptor donde se encuentran las células visuales que transforman la luz en impulsos eléctricos que el nervio óptico transmite al cerebro.

1.3.1.1- ESTRUCTURA MACROSCÓPICA

Se diferencian dos regiones:

- retina anterior o ciega: reviste la cara posterior del cuerpo ciliar, los procesos filiares y el iris;
- retina posterior o sensible: es la parte del ojo sensible a la luz, que desarrolla una función receptora e integradora de las imágenes que recibe.

En esta zona se puede distinguir un área de forma circular que se denominada papila y que corresponde al nervio óptico. Desde esta zona emergen los vasos sanguíneos que llegan a la retina. A la derecha de la papila se encuentra también una zona ovoidea, con una coloración rojiza, que carece de vasos sanguíneos y que se denomina fovea. La fovea es el área de la retina que proporciona la visión de más alta resolución y precisión. Y por último, la mácula que es la zona de la retina especializada en la visión fina de los detalles, de manera que hay ausencia de bastones entre los fotorreceptores, existiendo únicamente conos (Figura 1.3).

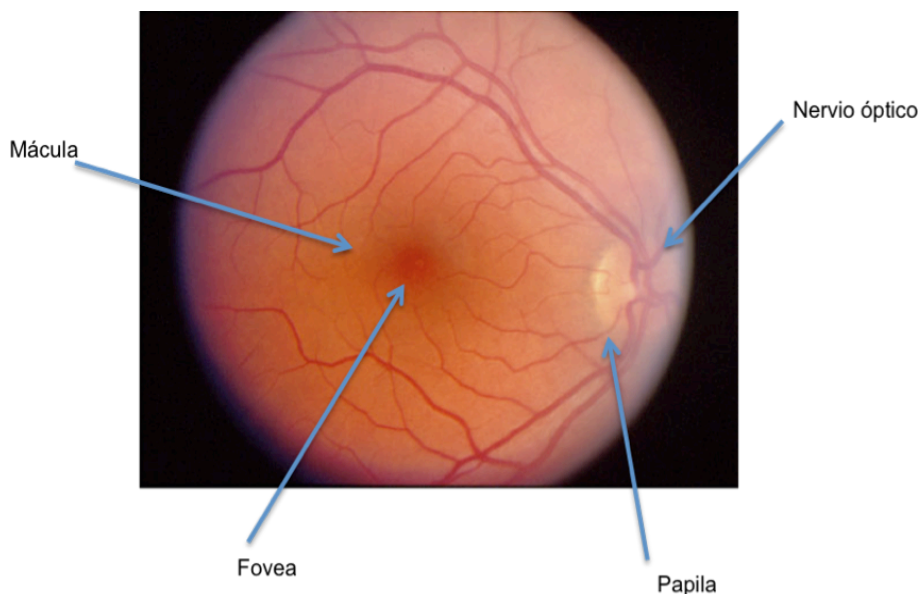


Figura 1.3. Fondo de ojo de un individuo sano.

1.3.1.2 - ESTRUCTURA MICROSCÓPICA

La sección vertical de la retina humana muestra una estructura estratificada compleja que incluye el epitelio pigmentario de la retina, las capas neuronales y las membranas limitantes externa e interna en las que se producen las conexiones sinápticas (Figura 1.4). Las células implicadas en las distrofias de retina (DR) son las células del epitelio pigmentario de la retina y los fotorreceptores (Haw AW, 1970; Krstic RV, 1997).

De fuera adentro, la retina se compone de 10 capas paralelas:

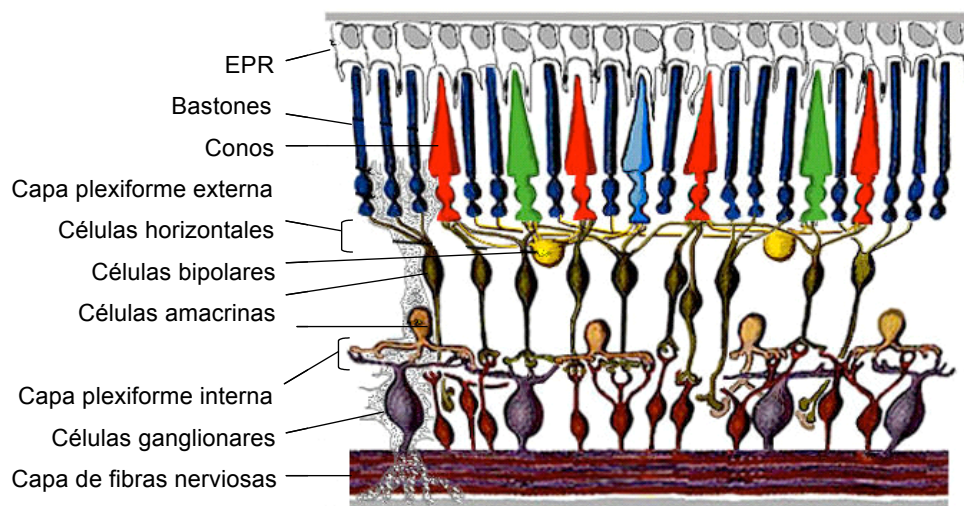


Figura 1.4. Estructura de la retina.

1- EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA (EPR)

Es la capa más externa de la retina. El EPR está constituido de una monocapa de células hexagonales pigmentadas que separa la coroides o capa vascular, altamente vascularizada, de los fotorreceptores de la retina y el medio intraocular. Está unido a la membrana de Bruch, que, a su vez, la separa de la coroides o capa vascular (Junqueira LC & Carneiro J, 1987).

Las funciones que desempeña el EPR son las siguientes:

- a) Respecto al proceso visual;
 - absorción de la luz que pasa desde los fotorreceptores, evitando de esta manera que se refleje.
 - relacionado con el metabolismo de la vitamina A.
- b) Como elemento estructural y de protección;
 - participa en la renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores mediante fagocitosis y digestión lisosómica.
 - constituye la barrera hematorretiniana externa.
 - permite el paso específico de metabolitos indispensables para la retina, gracias a un sistema de difusión facilitada.
 - reabsorbe los productos de la actividad neuronal de la retina y las sustancias eventualmente tóxicas, gracias a un sistema de transporte activo desde la retina hacia la coriocapilar.

2- CAPA DE LAS CÉLULAS FOTORRECEPTORAS

Un fotorreceptor es toda célula o mecanismo capaz de captar la luz. Existen dos tipos de células fotorreceptoras: los conos y los bastones. La estructura de los fotorreceptores está formada por dos regiones: el segmento externo y el segmento interno (Figura 1.5).

El segmento externo posee un gran desarrollo de membranas fotosensibles y se encuentra unido al segmento interno por un estrecho cilio, llamado cilio de conexión. Además, es el polo sensorial de la célula, pues está en contacto con el EPR y es donde tiene lugar el proceso de fototransducción. Es una prolongación celular que diferencia morfológicamente a los conos (cortos y gruesos) de los bastones (largos y delgados). Esta parte de los fotorreceptores está formada por unos mil discos apilados (Rawn JD, 1989). Éstos se encuentran rodeados de membrana plasmática, formada a partir de invaginaciones de la membrana

celular, que se separan de ésta en el caso de los bastones y que permanecen como tales invaginaciones en el caso de los conos.

Estas estructuras no son estáticas, sino que están sometidas a un proceso de renovación continuo:

- En los conos, los extremos más externos son fagocitados por las células del EPR durante el día, sobre todo al atardecer.

- En los bastones, los discos membranosos están continuamente reciclándose, se van añadiendo discos nuevos en la unión de los segmentos internos y externos y esto hace que los discos membranosos antiguos se vayan desplazando hacia la zona del EPR, donde son fagocitados y convertidos en fagosomas por las células del EPR durante el ciclo diurno, sobre todo al amanecer (Zinn KM & Marmor MF, 1979; Travis GH, 1997).

En el segmento interno, se encuentran el núcleo y la región axónica. Esta región celular también contiene el retículo endoplasmático rugoso, el aparato de Golgi y mitocondrias alargadas.

La unión entre segmentos internos y externos de los fotorreceptores se realiza a través de un cilio de conexión, a partir del cual se producen una serie de evaginaciones e invaginaciones de la membrana plasmática de los fotorreceptores que dan lugar a los segmentos externos.

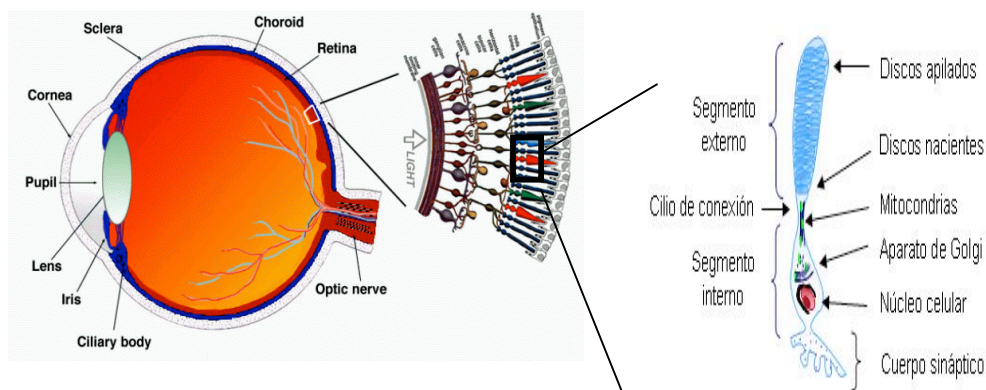


Figura 1.5. Representación esquemática del globo ocular, de la retina y del fotorreceptor.

Además de presentar diferencias morfológicas, los conos y los bastones difieren entre sí en su distribución y función. El número de conos en la retina es de aproximadamente seis millones y existen sólo en la mácula, la región central de la retina. En el centro de la mácula se encuentra la fovea, la región de mayor agudeza visual y donde los conos forman un mosaico hexagonal regular. Respecto a la función de los conos, son los que responden a elevados niveles de luminosidad y son los responsables de la visión diurna y en color (visión fotópica). Esto es debido a que contienen unos pigmentos visuales denominados opsinas que se encuentran en los segmentos externos y son proteínas que participan en la fotorrecepción, absorbiendo luz a determinadas longitudes de onda que le es específica y que llamamos espectro de absorción. En el caso de los conos, las opsinas están localizados en la bicapa lipídica de los repliegues y existen tres tipos y cada cono contiene uno de los tres tipos: La eritropsina que tiene mayor sensibilidad para las longitudes de onda largas (luz roja), que absorbe a 552 o 557 nanómetros (nm), dependiendo de la presencia de un cambio de nucleótido en el codón 180 que puede ser alanina o serina, la cloropsina con mayor sensibilidad para longitudes de onda medias (luz verde), que absorbe a 530 nm. Estas dos opsinas se localizan en el cromosoma Xq28. Por último la cianopsina, localizada en el cromosoma 7q31, absorbe a longitudes de onda más bajas (luz azul), a 426 nm. Es por ello que los conos dan lugar a la visión tricromática (Stockman A *et al.*, 2000) (Figura 1.6).

El número de bastones en la retina es de aproximadamente ciento cincuenta millones y se encuentran distribuidos de forma periférica. Por lo tanto, a medida que nos alejemos de la fovea, disminuye la densidad de conos, aumentando la de bastones. Son los responsables de la visión nocturna (visión escotópica), sin detalles ni color. Esto es debido a que contienen rodopsina, una proteína que se localiza en los discos membranosos y que posee un umbral de excitación más bajo y que, por lo

tanto, responde a intensidades de luz muy bajas, siendo su máximo de absorción de 493 nm (Merbs SL & Nathans, 1992).

Por lo tanto, los fotorreceptores responden a la luz en función de los pigmentos visuales que contengan. Estos pigmentos visuales se encargan del metabolismo de los fotorreceptores. Cada célula contiene solamente un tipo de pigmento visual. El 11-cis-retinaldehído es el cromóforo para los cuatro pigmentos visuales. Un cromóforo es una molécula capaz de absorber la luz. Se dispone paralelamente al plano de la bicapa y perpendicularmente a las α -hélices, posición que le permite un aumento en la captura de fotones. Los pigmentos visuales son proteínas que participan en la fotorrecepción: absorben luz a determinadas longitudes de onda que le es específica y que llamamos espectro de absorción. La luz absorbida se transformará en energía.

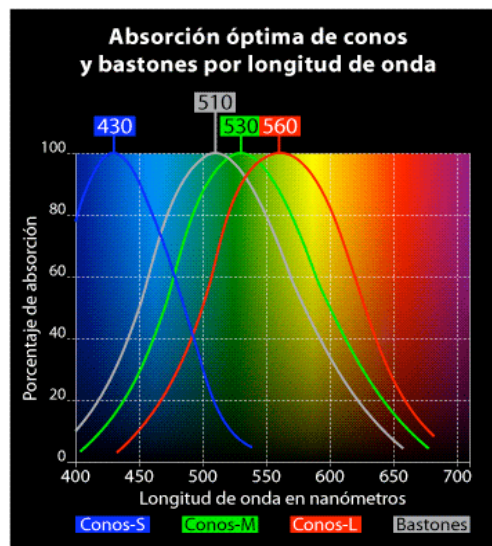


Figura 1.6. Espectros de absorción de los pigmentos de los fotorreceptores.

3- MEMBRANA LIMITANTE EXTERNA

Realmente no es una membrana, sino que se trata de una región de zonas adherentes entre las células de Müller y los fotorreceptores. Las células de Müller son células de la neuroglía, dispuestas verticalmente a todas las capas de la retina y que proyectan microvellosidades hacia las capas de los fotorreceptores, rodeándolas. Desempeñan funciones esenciales para la supervivencia de la retina: constituyen un tejido de sostén, intervienen en la nutrición retiniana mediante el acumulo de glucógeno y ejercen una función defensiva mediante fagocitosis.

4- CAPA NUCLEAR EXTERNA

Está formada por los núcleos celulares de las células fotorreceptoras. Los núcleos de los bastones son más pequeños y redondos que los de los conos.

5- CAPA PLEXIFORME EXTERNA

Es la región de conexión sináptica entre las células fotorreceptoras y las dendritas de las células bipolares y horizontales. Las células bipolares son las segundas neuronas del proceso visual. Establecen sinapsis con los fotorreceptores a través de las dendritas y a su vez, emiten su axon a la capa plexiforme interna. Su función es crucial para detectar contrastes débiles o cambios en la intensidad de luz (Boycott BB *et al.*, 1987). Respecto a las células horizontales, también extienden sus dendritas y axones. Sus terminaciones dendríticas forman sinapsis tripartitas o *tríadas* con los conos y las células bipolares de los conos. Las terminaciones derivadas de los axones se extienden de manera lateral hacia las *esférulas*, que es como se denomina a las conexiones que se establecen entre los bastones y las células bipolares de los bastones.

6- CAPA NUCLEAR INTERNA

Está formada por los núcleos celulares de las células bipolares, de las horizontales y también de las células amacrinas. Éstas no poseen axón, pues el término amacrina quiere decir “*sin axón*”. En cambio, sus dendritas sinaptan con las células bipolares, con las células ganglionares y con otras células interplexiformes situadas en la capa plexiforme interna.

7- CAPA PLEXIFORME INTERNA

Es la región de conexión sináptica entre células bipolares, amacrinas y ganglionares. Se producen sinapsis axo-dendríticas entre el axón de las células bipolares y las dendritas de las células amacrinas y ganglionares. De manera, que es en esta capa donde tiene lugar el tercer relevo sináptico, y son las células ganglionares, las mediadoras de este último relevo.

8- CAPA DE CÉLULAS GANGLIONARES

Está formada por los núcleos de las células ganglionares. La función de estas células consiste en distinguir y seleccionar la información visual que se transmite al cerebro (Lennie P *et al.*, 1990).

9- CAPA DE FIBRAS DEL NERVIO ÓPTICO

Compuesta por los axones de las células ganglionares que forman el nervio óptico, que abandona la retina por el punto ciego.

10- MEMBRANA LIMITANTE INTERNA

Al igual que la membrana limitante externa, no se trata realmente de una membrana sino que es una lámina basal que separa las células de Müller.

1.3.1.3- EL PROCESO DE FOTOTRANSDUCCIÓN

La fototransducción es el proceso a través del cual *la información* captada por las células fotorreceptoras se convierte en señal eléctrica y luego se trasmite al cerebro. El proceso de fototransducción tiene lugar concretamente, en los discos del segmento externo tanto de los conos como de los bastones. Aunque la estructura de los conos y bastones es diferente, el mecanismo de fototransducción en ambos es muy similar. El fotorreceptor es sensible a la luz y responde al estímulo luminoso variando su potencial de membrana y, como consecuencia, varía la emisión del neurotransmisor glutamato al espacio sináptico en la capa plexiforme externa.

En el caso del bastón, como hemos comentado anteriormente, la molécula fotosensible de los discos del segmento externo es la rodopsina, que consta de una parte proteica, la opsina y un grupo prostético unido covalentemente, el *11-cis-retinal*. Éste es hidrofóbico, por lo tanto tiene cierta facilidad en atravesar membranas y así poder unirse a la rodopsina.

Fase luminosa

La cascada visual comienza con la captación de un fotón de luz, produciendo la isomerización del 11-cis-retinal a todo-trans-retinal. Esta isomerización requiere energía que es aportada por la luz. Este proceso provoca la activación de la rodopsina que pasa por distintos estados

energéticos hasta que alcanza su forma más activa y estable: *metarrodopsina II*.

La rodopsina activada se une a la *transducina*, siguiente proteína de la cascada. Se trata de una proteína heterotrimérica que consta de tres subunidades (α , β , γ). La subunidad α de la *transducina* es activada por la rodopsina. Entonces, esta subunidad se disocia de las subunidades β y γ , que son inhibitorias, y cataliza la conversión de GDP a GTP.

La transducina activada es capaz de unirse a las subunidades α , β y γ de la *fosfodiesterasa*. Ésta es una proteína heterotetramérica que consta de dos tipos de subunidades activadoras (α , β) y dos subunidades inhibitorias (γ). La unión de la transducina provoca la disociación de las subunidades inhibitorias, de manera que la fosfodiesterasa se activa e hidroliza el GMPc a GMP. El GMPc se encuentra en abundancia en el interior del citoplasma del receptor, y la fosfodiesterasa produce una disminución de éste, a la vez que se logra aumentar la concentración de GMP.

El GMPc se relaciona con canales catiónicos que dejan pasar $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que mantienen al fotorreceptor despolarizado junto a estos canales catiónicos se encuentra también un intercambiador que se encarga de sacar $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ aunque a una velocidad menor por lo cual se logra mantener un estado de despolarización.

En fase luminosa, como hemos descrito, disminuyen los niveles de GMPc y debido a esto se cierran los canales catiónicos de la membrana plasmática del bastón, con lo cual sólo se mantiene el trabajo del intercambiador que saca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, produciendo un aumento de polaridad de la membrana.

Esta hiperpolarización genera el potencial receptor, constituyendo la primera señal eléctrica de transmisión de información neuronal (Yau KW, 1994).

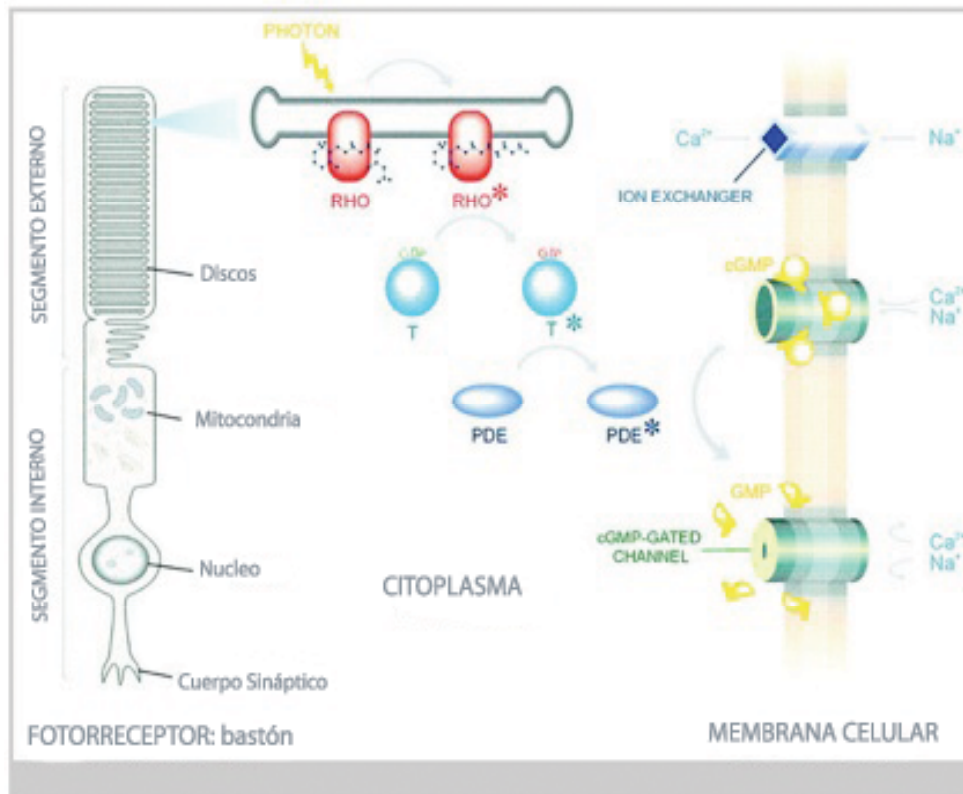


Figura 1.7. Esquema de las proteínas de la cascada visual (G. Jane Farrar *et al.*, 2002).

Fase oscura

El descenso de las concentraciones de Ca^{2+} provoca la activación de la *recoverina*, enzima que a su vez activa la *guanilato ciclasa*, que reconstituye los niveles de GMPc. De esta manera, se reanuda la apertura de los canales dependientes de GMPc.

Debido a esto se produce un aumento de Ca^{2+} que a su vez inhibe la actividad de la *recoverina*. La *transducina GTPasa* se encarga de catalizar la separación de la *transducina* y la *fosfodiesterasa*, permitiendo su inactivación al unirse de nuevo a sus unidades inhibitorias.

Para que termine el proceso de fotoexcitación, también es necesaria la inactivación de la *metarrodopsina II* por la fosforilación de

residuos de serina y treonina de su extremo carboxilo terminal, mediante la enzima *rodopsina quinasa*.

Posteriormente, la rodopsina fosforilada se une a la *arrestina*. La actuación de ambas enzimas evita la unión de la *rodopsina* a la *transducina*, permitiendo que se paralice el proceso (Wilden U *et al.*, 1996).

Mientras, el todo-trans-retinal (el cromóforo) es reducido rápidamente a todo-trans-retinol, por la enzima retinol deshidrogenasa y mediado por el paso de NADPH a NADP. Para que se produzca esta reducción, es necesario que el todo-trans-retinal, localizado en la membrana intradiscal, sea transportado al citoplasma del fotorreceptor por la proteína RmP (Sun H *et al.*, 2000), como se vera más adelante.

El proceso de fototransducción que se ha descrito en los bastones sucede de forma similar en los conos. La diferencia radica en la longitud de onda a la que absorben las opsinas de los distintos conos.

1.4- FUNCIONAMIENTO DEL OJO

En general, los ojos funcionan como unas cámaras fotográficas sencillas. La lente del cristalino forma en la retina una imagen invertida de los objetos que enfoca y la retina se corresponde con la película sensible a la luz.

El enfoque del ojo se lleva a cabo debido a que la lente del cristalino se aplana o redondea, es un componente del ojo con forma biconvexa, que junto con la córnea, constituyen el objetivo del ojo.

Por detrás de la cornea se encuentra el iris, un músculo que controla la pupila, una abertura dilatable y contráctil, con la función de regular la iluminación que le llega a la retina.

La retina es la capa interna del ojo donde se encuentran las células visuales y funciona como una pantalla donde la córnea y el cristalino proyectan la luz percibida. Ésta se transforma en la retina en impulsos eléctricos que el nervio óptico transmite al cerebro. Esta transformación es posible gracias a los conos y los bastones que son las células sensoriales de la retina. Los conos funcionan de día y en ambientes iluminados y hacen posible la visión en los colores. En cambio, los bastones se activan en la oscuridad y sólo permiten distinguir el negro, el blanco y los distintos grises.

2- LA GENÉTICA HUMANA

La genética es el campo de las ciencias biológicas que trata de comprender cómo la herencia biológica es transmitida de una generación a la siguiente. El objeto de estudio son los patrones de herencia.

El genoma humano es la secuencia completa de la molécula ácido desoxirribonucleico (ADN), es decir, la lista de los aproximadamente 3.200 millones de pares de bases de ADN o nucleótidos, que constituyen los 46 cromosomas; estos pares de bases se agrupan en los 20.000-25.000 genes que se encuentran en el núcleo de cada una de nuestras células.

El término "Gen" proviene de la palabra griega γένος y significa "raza, generación". Los genes se forman de segmentos de ADN que codifica la información genética en las células. El ADN controla la estructura, función y comportamiento de las células y puede crear copias exactas de sí mismo.

Los genes contienen la información necesaria para determinar la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Éstas, a su vez, desempeñan una función importante en la determinación del fenotipo final. En genética, el verbo *codificar* se usa frecuentemente y significa que un gen contiene las instrucciones para sintetizar una proteína.

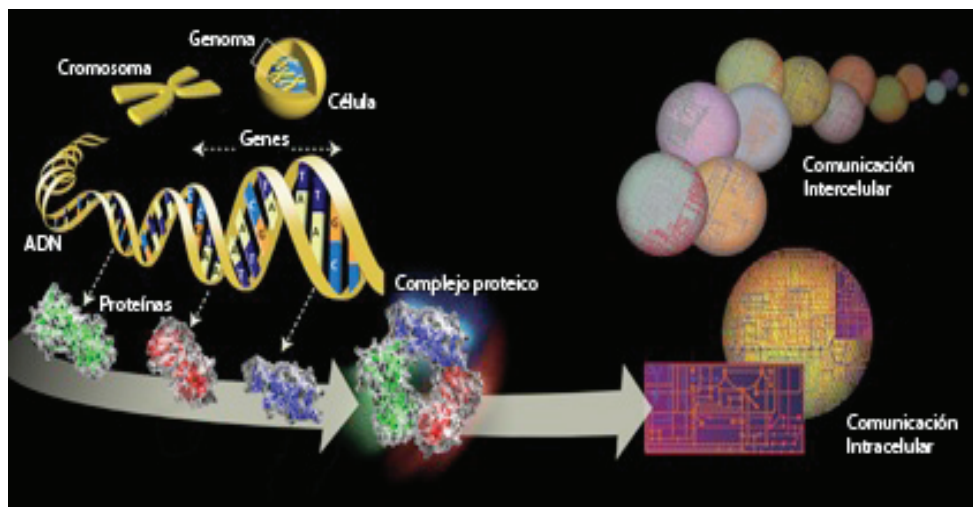


Figura 1.8. Proceso de codificación de la información genética en las células.

Un mismo gen puede presentarse con distinto tipo de información en cada individuo, a cada tipo de información se le denomina alelo, así para el gen responsable del color de los ojos podemos encontrar el alelo que define el color marrón o el alelo que define el color azul. De manera que la herencia y la variación constituyen la base de la Genética.

La genética se subdivide en varias ramas, como:

- Clásica o mendeliana: estudia los cromosomas y los genes y cómo se heredan de generación en generación.
- Molecular: estudia el ADN, su composición y la manera en que se duplica. Asimismo, estudia la función de los genes desde el punto de vista molecular.
- de Poblaciones y evolutiva: estudia el comportamiento de los genes en una población y de cómo esto determina la evolución de los organismos.
- del desarrollo: es el estudio de los genes que controlan el desarrollo de los organismos.
- Cuantitativa: analiza el impacto de múltiples genes sobre el fenotipo, muy especialmente cuando estos tienen efectos de pequeña escala.

3- ENFERMEDADES RARAS DE ORIGEN GENÉTICO

Las Enfermedades Raras, incluidas las de origen genético, son aquellas enfermedades con peligro de muerte o de invalidez crónica, que tienen una prevalencia baja, menor de 5 casos por cada 10.000 habitantes en la Comunidad, según la definición de la Unión Europea.

El concepto de Enfermedades Raras, también conocidas como: enfermedades poco comunes, enfermedades minoritarias o enfermedades poco frecuentes son un conjunto de enfermedades que tienen ciertas características comunes:

- Aparecen con una baja frecuencia
- Presentan muchas dificultades diagnósticas y de seguimiento
- Tienen un origen desconocido en la mayoría de los casos
- Conllevan múltiples problemas sociales
- Existen pocos datos epidemiológicos
- Plantean dificultades en la investigación debido a los pocos casos
- Carecen en su mayoría de tratamientos efectivos

Se estima que hay entre 5.000 y 8.000 enfermedades raras, de éstas, el 80% tienen un origen genético y se estima que entre el 3 y el 4% de los recién nacidos está afectado por una enfermedad genética rara.

La investigación genética es clave en el tratamiento de las enfermedades raras.

4- RETINOPATÍAS HEREDITARIAS

Las enfermedades hereditarias de la retina, a excepción de la retinosis pigmentaria, son raras. Esto hace que su identificación y diagnóstico exacto sea difícil.

4.1- INTRODUCCIÓN

Las distrofias hereditarias de la retina son un conjunto de enfermedades degenerativas caracterizadas por su evolución, generalmente progresiva, causadas por la afectación primaria de los fotorreceptores. Presentan una frecuencia de 1 en 3000 individuos. Son trastornos hereditarios que se caracterizan por su evolución progresiva y

por no tener, de momento, un tratamiento ni paliativo ni curativo, lo que conlleva a la pérdida total o parcial de la visión (Rivolta C *et al.*, 2002).

De manera general, las distrofias de retina (DR) comienzan con una pérdida de los fotorreceptores, que es seguida por alteraciones en el epitelio pigmentario y en la glía de la retina. Finalmente, las neuronas de la retina profunda, los vasos y la cabeza del nervio óptico también se ven afectados (Milam *et al.*, 1998).

4.2- HETEROGENEIDAD DE LAS RETINOPATÍAS

Una de las principales características de las DR es su elevada heterogeneidad, tanto a nivel clínico, diferentes mutaciones en el mismo gen pueden causar distintas enfermedades, como a nivel genético, debido a que mutaciones en diferentes genes pueden causar la misma enfermedad.

Además, las manifestaciones de cada una de las diversas formas de DR varían en función del patrón de herencia con el que se transmiten a las siguientes generaciones.

4.2.1- HETEROGENEIDAD CLÍNICA

Las DR además de ser un grupo de enfermedades hereditarias que se deben a distintas mutaciones y se transmiten por diferentes patrones de herencia, presentan una gran heterogeneidad desde el punto de vista clínico, ya que distintos genotipos se corresponden con distintos fenotipos.

Fenotípicamente, las DR se pueden clasificar en:

- formas periféricas, en las cuales, los bastones son las células de la retina que se ven afectadas inicialmente; incluyen las formas típicas de Retinosis Pigmentaria (RP).
- formas centrales, que se caracterizan por afectación de los conos; incluyen las distrofias maculares (DM), las distrofias de conos, etc.

- formas mixtas, con degeneración de conos en su inicio, pudiendo afectarse de forma secundaria los bastones; incluyen las distrofias de conos y bastones (DCB).

Por otro lado, las DR se pueden clasificar según su heterogeneidad clínica en:

Formas no sindrómicas

Son aquellas DR en las que únicamente se manifiesta patología ocular. Se presentan asociadas a los modelos de herencia mendeliana.

Formas sindrómicas

Son aquellas DR que aparecen acompañadas de un cuadro clínico complejo, con manifestaciones extraoculares. Suponen un 13-18% de todas las retinopatías hereditarias, y se han descrito del orden de 77 síndromes distintos (www.retina-internacional.org). Pueden deberse a una herencia mitocondrial, herencia dominante, herencia recesiva, trialelismo o reordenamientos cromosómicos.

Dentro de las formas sindrómicas, las más frecuentes son el Síndrome de Usher (recesivo) y el Síndrome de Bardet-Biedl (recesivo y trialélico).

Por lo tanto, a la hora de diagnosticar a un paciente, es importante determinar si se trata de una degeneración exclusivamente ocular o bien si forma parte de un trastorno sistémico ya que algunas retinopatías son un síntoma frecuente de distintos errores metabólicos congénitos, especialmente en alteraciones del sistema peroxisomal, errores del metabolismo de los ácidos grasos y defectos de la cadena respiratoria mitocondrial.

4.2.2- HETEROGENEIDAD GENÉTICA

Heterogenidad alélica

La heterogenidad alélica se debe, a la presencia de diferentes mutaciones a lo largo de la secuencia de un mismo locus (gen), que desencadenan el mismo proceso degenerativo.

Heterogenidad no alélica

Designa la presencia de mutaciones en distintos genes o loci con la característica de que todas ellas conducen a la aparición de la misma enfermedad.

Prácticamente, en todos los cromosomas se encuentran genes involucrados en alguna patología retiniana. Hasta el momento se han localizado un total de 197 loci, de los cuales 150 ya han sido identificados o clonados (www.sph.uth.tmc.edu/Retnet).

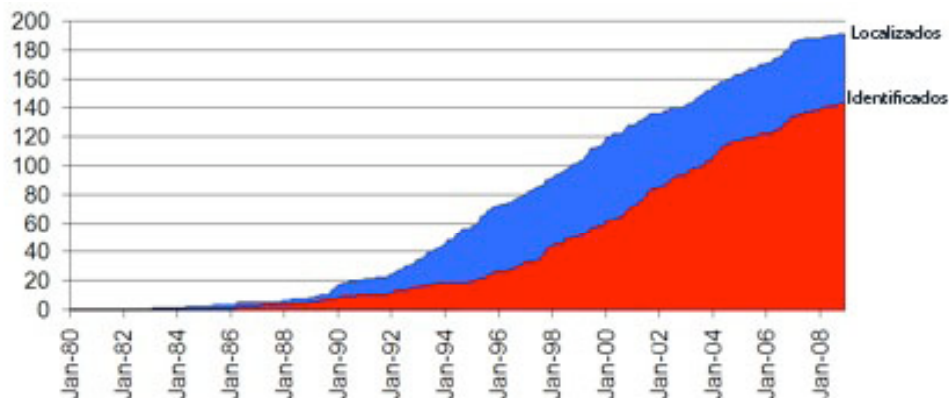


Figura 1.9. Representación gráfica de los genes localizados e identificados, implicados en distrofias de retina.

4.2.3- HETEROGENEIDAD EN EL PATRÓN DE HERENCIA

Asociados a las DR se han descrito diferentes patrones de herencia Mendeliana y No Mendeliana.

- Patrones de Herencia Mendeliana

Herencia autosómica recesiva (AR)

En este tipo de herencia podemos encontrar varios miembros afectados de una misma generación (transmisión horizontal). Los progenitores son portadores sanos que presentan un alelo sano y otro mutado. Son personas fenotípicamente normales pero que pueden transmitir su alelo defectuoso a sus hijos (varón o hembra). De manera que, la enfermedad se manifiesta cuando alguno de los hijos (varón o hembra) hereda el alelo mutado del padre y el alelo mutado de la madre.

Por tanto, la enfermedad se hereda por ambas ramas familiares. El riesgo de padecer una enfermedad con este tipo de herencia aumenta con la consanguinidad o la endogamia, pero puede suceder que individuos sin ningún parentesco entre sí tengan el mismo gen alterado, por lo que tendrán un riesgo de manifestación de la enfermedad del 25% para cada hijo.

Casi todas las enfermedades causadas por la falta de una enzima esencial, son de herencia recesiva.

Herencia autosómica dominante (AD)

Este modelo de herencia se caracteriza porque aparece al menos un afecto en cada generación y los afectados tienen un progenitor igualmente afectado, por lo tanto el patrón de herencia ofrece un aspecto vertical.

Varones y hembras están afectados por igual, debido a que el gen alterado se encuentra en alguno de los veintidós autosomas.

En este caso, la enfermedad se hereda únicamente por una de las ramas familiares.

El riesgo de transmisión es del 50% en cada hijo (varón o hembra) de un afecto. La transmisión de varón a varón excluye la posibilidad de que el gen causante de la enfermedad este ubicado en el cromosoma X, que en los varones procede de la madre.

Herencia ligada al cromosoma X (XL)

En este tipo de patrón de herencia, el gen alterado se encuentra en el cromosoma X, no en un autosoma.

Los varones que heredan una copia del cromosoma X alterado son afectados por la enfermedad. No existe transmisión de varón a varón, puesto que el padre afecto únicamente aporta el cromosoma Y a su hijo varón. Sin embargo, todas sus hijas serán portadoras de la enfermedad.

Las hembras portadoras de un alelo mutado transmiten la enfermedad a sus descendientes sin padecerla. La probabilidad de tener hijos afectados e hijas portadoras es de un 50%.

Algunas portadoras pueden presentar síntomas de la enfermedad, debido a la inactivación al azar del cromosoma X (MacDonald IM, 1997).

- Patrones de Herencia No Mendeliana

Herencia digénica y trialelismo

Es una condición génica causada por la interacción de dos o más mutaciones en dos genes diferentes no ligados, donde sus productos proteicos están funcionalmente conectados.

En otros casos, genes recesivos pueden verse afectados por un tercer alelo mutado que ejerce un efecto modificador, suavizando o agravando el fenotipo. Un ejemplo de trialelismo se produce en el Síndrome de Bardet-Biedl y en la Amaurosis Congénita de Leber.

Herencia mitocondrial

Las mitocondrias son estructuras de la célula y se encuentran en el citoplasma. Estos orgánulos celulares contienen su propio genoma, es el llamado ADN mitocondrial.

La herencia mitocondrial es matrilineal, es decir, el ADN mitocondrial se hereda solo por vía materna.

En el genoma mitocondrial, existen genes involucrados en patologías oftalmológicas. Algunos ejemplos son la neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL), el síndrome de Kearns-Seyre (KSS) y la neuropatía, ataxia y retinosis pigmentaria (NARP).

Penetrancia incompleta

El término penetrancia indica, en una población, la proporción de individuos que presentan un genotipo causante de enfermedad y que expresan el fenotipo patológico. Cuando esta proporción es inferior al 100%, se considera que el genotipo patológico tiene una penetrancia *reducida o incompleta*.

La penetrancia incompleta se debe a que el fenotipo asociado puede tener una causa multifactorial y por tanto, su expresión fenotípica puede verse inhibida por otros factores, ya sean ambientales o genéticos.

Disomía uniparental

La disomía uniparental hace referencia a dos situaciones:

- los dos cromosomas homólogos de un par provienen del mismo progenitor, denominado como *heterodisomía*.
- el par de cromosomas homólogos proceden de un solo cromosoma parental que se ha duplicado, *isodisomía*.

El síndrome de Angelman y el síndrome de Prader-Willi son ejemplos de los trastornos causados por la disomía uniparental.

No hay evidencia de que las DR se manifiesten más temprano en las generaciones sucesivas, es decir, no se produce el fenómeno de anticipación genética producido por la expansión de tripletes en la secuencia de ADN.

5- RETINOPATÍAS HEREDITARIAS CENTRALES:

DISTROFIAS MACULARES

La degeneración macular del ojo es una enfermedad degenerativa que afecta al centro de la retina y se caracteriza por alteraciones de la pigmentación, estrechamiento arteriolar, cierto grado de atrofia óptica y deterioro progresivo de la función visual. La dispersión y acumulación del pigmento retiniano da lugar a alteraciones visibles en el examen oftalmológico, que van desde el aspecto moteado del pigmento hasta las acumulaciones en forma de espículas óseas.

La mayoría de las distrofias maculares presentan datos clínicos muy semejantes y características comunes: el material acumulado es de tipo lipofucsina, se deposita en el epitelio pigmentario y las alteraciones afectan más severamente a la zona de la mácula. Sin embargo, su curso y pronóstico pueden ser muy diferentes.

6- DIAGNÓSTICO OFTALMOLÓGICO

Es importante que el diagnóstico oftalmológico sea preciso para dar un consejo genético adecuado.

6.1- ANTECEDENTES PERSONALES Y FAMILIARES

El diagnóstico temprano de las DR requiere de una historia completa, en la que se resaltan tres aspectos fundamentales:

1. Sintomatología y edad de comienzo: La manera en que se presentan los síntomas varían de un caso a otro, especialmente en cuanto a la severidad y velocidad con que avanzan. Normalmente las manifestaciones más comunes que el paciente acusa son:

- pérdida de la agudeza visual: Se pierde visibilidad o se distorsionan las imágenes que se encuentran en el campo de visión central.
- reducción del campo visual: Se caracteriza por disminución de la visión periférica (panorámica) también conocido con el nombre de visión “en túnel”.
- intolerancia a la luz o fotofobia: Son típicas las molestias ante la luz intensa, principalmente del Sol.
- mala adaptación a la oscuridad o ceguera nocturna: Deficiente adaptación a la oscuridad; se debe particularmente al daño en los bastones de la retina.

Los primeros síntomas de la enfermedad comienzan a una edad muy variable, existiendo formas muy tempranas (incluso congénitas), formas juveniles (entre la segunda y tercera década de vida) y formas adultas que aparecen en la vejez.

2. Árbol genealógico: Debido al carácter hereditario que presentan estas patologías, es preciso reconstruir al menos tres generaciones del individuo afecto. También hay que tener en cuenta la posible existencia de consanguinidad en la familia, sobre todo en aquellos casos en los que se trate de una enfermedad de herencia recesiva.

3. Antecedentes personales: Es preciso tener en cuenta, tanto los antecedentes oculares que se deben a enfermedades puramente oftalmológicas, como a alteraciones sistémicas que repercutan al ojo o a sus anejos.

4. Antecedentes familiares: Los antecedentes familiares de interés resultan fundamentales, tanto en relación al proceso de la enfermedad ocular, como a cualquier trastorno no ocular: enfermedades metabólicas o neurológicas.

6.2- EXPLORACIÓN OFTALMOLÓGICA

La exploración oftalmológica incluye, entre otras, las siguientes pruebas:

1. Funduscopia: Exploración y estudio del fondo de ojo por medio de un oftalmoscopio; un instrumento pequeño y de fácil manejo que cuenta con un haz de luz y un disco rotatorio que contiene lentes de diferente poder dióptrico, las cuales permiten enfocar el fondo del ojo.

2. Campimetría: Es la exploración del campo visual, es decir del espacio que es capaz de abarcar un ojo estando inmóvil. El campo visual se divide en central, y en espacio restante o *campo periférico*. Existen diferentes tipos de campimetría, entre los cuales destaca la campimetría de Goldman, que proporciona información sobre la densidad del escotoma (zona sin visión) en valor absoluto y la representa en escala de grises.

3. Angiofluoresceingrafía (AFG): Es una prueba de imagen que permite visualizar los vasos sanguíneos y requiere para ello de sustancias de

contraste que, al circular por ellos, permitan la observación de su forma, grosor, trazado y permeabilidad.

4. Electrorretinograma (ERG): Consiste en el registro de la diferencia de potencial eléctrico que se genera en la retina tras estimular el ojo con un flash de luz blanca. Sirve para evaluar la funcionalidad de la retina, y más concretamente, de los bastones (ERG escotópico), de los conos (ERG fotópico) o de ambos sistemas fotorreceptores (ERG mixto).

5. Agudeza visual: Es la capacidad para percibir, detectar o identificar objetos espaciales con unas condiciones de iluminación buenas. Para medir la agudeza visual se emplean diferentes test. Entre ellos, el test de Snellen, formado por filas de letras que van de tamaño más grande a más pequeño conforme bajamos la mirada. Cuanto más abajo logre ver nítido el paciente, mayor agudeza visual tendrá. El test de visión de los colores 100-HUE Farnsworth-Munsell, compuesta de cuatro conjuntos de fichas de color removibles con un total de 85 fichas de referencia de color a lo largo del espectro visible. Las anomalías en la visión de color son detectadas cuando el paciente es incapaz de colocar las fichas en el orden correcto.

6. Electrooculograma (EOG): Es un examen que consiste en colocar pequeños electrodos cerca de los músculos de los ojos para medir el movimiento de éstos.

7. Biomicroscopía del segmento anterior: Permite detectar cataratas subcapsulares posteriores, uno de los hallazgos más frecuentes en los pacientes con RP.

8. Tomografía de coherencia óptica (TCO): Representa los estratos de la retina en forma de una imagen de sección transversal de alta resolución. Los colores calientes -rojo y blanco-, corresponden a zonas de alta reflectividad. Los colores fríos -azul y negro-, cuentan con una reflectividad más débil y caracterizan células ganglionares, fotorreceptores y la coroides

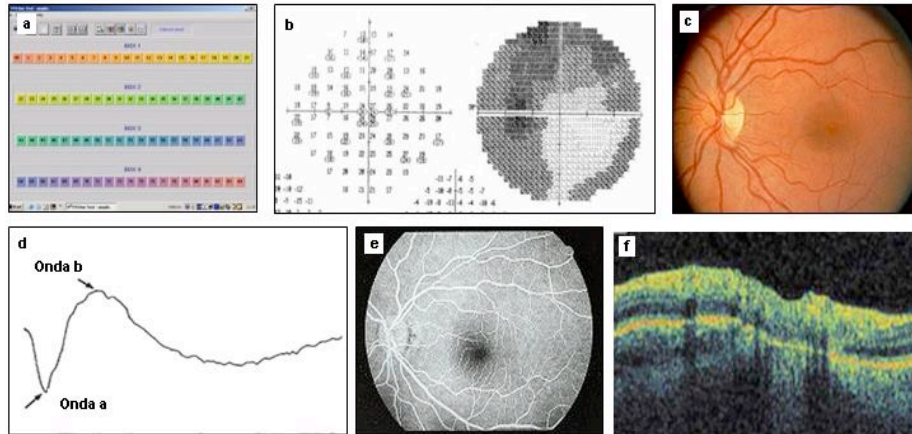


Figura 1.10. a) Test de los colores 100-HUE Farnsworth-Munsell. b) Campimetría: las zonas oscuras representan las regiones en las que se produce el escotoma. c) Fondo de ojo de un individuo sano. d) ERG con patrón bifásico típico de un individuo normal. e) Imagen obtenida por AFG de un individuo sano, en el que se observa la fluorescencia de los vasos sanguíneos de la coroides. f) Imagen obtenida por TCO, en la que se observan las distintas capas celulares.

7- ENFERMEDAD DE STARGARDT (STGD)

La Enfermedad de Stargardt (STGD; MIM #248200) es una forma de degeneración macular juvenil, con un patrón de herencia autosómico recesivo, descrita por primera vez por Karl Stargardt en 1909. Se calcula que la prevalencia de la Enfermedad de Stargardt es de 1 entre 10.000, por lo que está considerada como la distrofia macular hereditaria más común. De hecho, la frecuencia de portadores en la población se ha estimado en torno a un 2% (Blacharski PA, 1988).

7.1- RASGOS CLÍNICOS

Esta distrofia macular se presenta entre la 1ª y la 2ª década de vida. Se caracteriza por una severa disminución de la agudeza visual central mientras que la visión periférica es normal. En la mayor parte de los casos, los pacientes presentan una agudeza visual normal durante su infancia (Allikmets *et al.* 1997a, 1997b; Zhang K *et al.*,1995). Desde un punto de vista histopatológico, el rasgo más característico es la aparición de acúmulos de lipofucsina que se depositan en forma de motas amarillentas (*yellowish flecks*) hacia el polo posterior del epitelio pigmentario de la retina (EPR). En los estadios más avanzados, se observa en la mácula una gran zona atrófica.

Otros hallazgos oftalmológicos muestran, mediante angiofluoresceingrafía, un fenómeno conocido como *coroides oscura o silente*: la circulación retiniana destaca considerablemente sobre una coroides oscura, debido a que la fluorescencia de los coriocapilares se ve bloqueada por las células del EPR que contienen lipofucsina. El electroretinograma (ERG) y el electroculograma (EOG) pueden ser normales en estadios tempranos, pero se muestran moderadamente alterados en las formas más avanzadas de la enfermedad (Aaberg, 1986).

Una variante de la Enfermedad de Stargardt es el *fundus flavimaculatus*. En 1961, Franceschetti y Francois usaron por primera vez este término para describir un fondo de ojo con motas blanco-amarillentas de forma irregular, que aparecían dispersas por todas partes. Por lo general, se considera un Stargardt cuando los acúmulos de lipofucsina se disponen en el polo posterior del EPR y la pérdida de visión comienza en 1ª o 2ª década de vida. Sin embargo, el término fundus flavimaculatus se emplea cuando estos acúmulos están dispersos por todo el fondo de ojo, la enfermedad tiene un comienzo más tardío y existe cierta preservación de la agudeza visual. Ambas maculopatías se deben a mutaciones en el gen *ABCA4*.

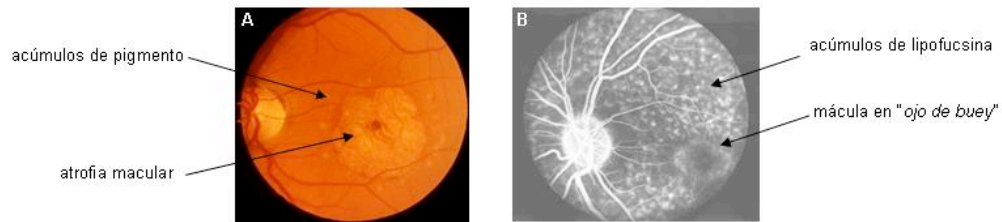


Figura 1.11. A) Fondo de ojo de un paciente con Enfermedad de Stargardt (STGD); mácula atrófica y con acúmulos amarillos de pigmento a su alrededor. B) AFG (angiofluoresceingrafía) que muestra la *coroides oscura* del paciente y la fluorescencia de los acúmulos de lipofucsina; también se aprecia el patrón típico en "ojo de buey".

7.2- LA PROTEÍNA: ABCA4/RmP

La proteína codificada por el gen *ABCA4* se denomina *Rim Protein* (RmP), posee dicho nombre porque se localiza en los bordes (en inglés *rims*) de los discos del segmento externo de los fotorreceptores.

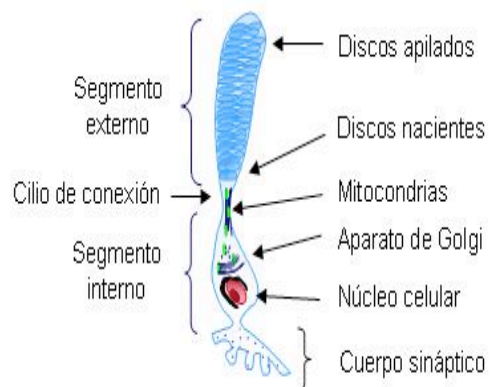


Figura 1.12. Estructura del fotorreceptor.

ABCA4 forma parte de la superfamilia de transportadores de tipo ABC (*adenosin triphosphate-binding cassette*) (Figura 1.13). Muchas de estas proteínas utilizan ATP para transportar sustratos a través de las membranas celulares (Azarian Sm & Travis GH, 1997).

Las proteínas transportadoras ABC contienen dos dominios transmembrana y dos de unión a nucleótidos (NBDs; *Nucleotide-binding domains*).



Figura 1.13. Estructura de la proteína Rmp (www.retina-international.org).

En condiciones normales la proteína RmP, localizada en la membrana intradiscal del segmento externo de los fotorreceptores, transporta un compuesto denominado todo-trans-retinal o N-RPE (N-retinilideno-fosfatidiletanolamina) desde dicha membrana al citoplasma del fotorreceptor (Sun H *et al.*, 2000). Es en el citosol, donde el todo-trans-retinal se reduce a todo-trans-retinol. Esta molécula atraviesa la membrana plasmática del segmento externo y es capturado por las células del EPR, donde se reconvierte en 11-cis-retinal (Figura 1.14). Por lo tanto, la función de esta proteína es transportar derivados de la vitamina A en los segmentos externos de los fotorreceptores después de su exposición a la luz.

En ausencia de la proteína RmP, su sustrato comienza a acumularse en el espacio intradiscal y al unirse una segunda molécula se genera un nuevo compuesto A2PE (N-retinilideno-N-retinil-fosfatidiletanolamina) que se hidroliza, originando un fluoróforo de lipofucsina denominado A2E (N-retinilideno-N-retinil-etanolamina), cuya acumulación es tóxica para las células del EPR, que son las encargadas del aporte de nutrientes y del reciclaje de los fotorreceptores. De forma secundaria al mal funcionamiento de estas células, se produciría la muerte de los fotorreceptores.

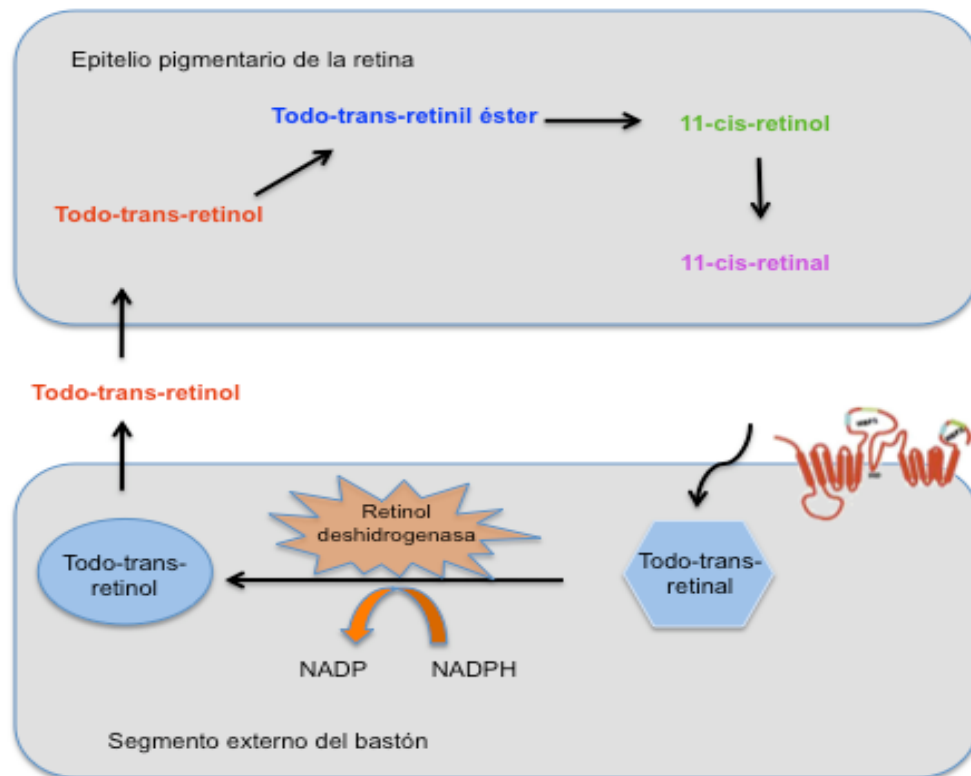


Figura 1.14. Ciclo de los retinoides. Para el correcto funcionamiento de la vía visual, la proteína RmP, codificada por el gen *ABCA4* debe transportar la molécula de *todo-trans-retinal* desde el segmento externo del fotorreceptor hacia el EPR.

7.3- EL GEN: ABCA4

El primer locus para la enfermedad de Stargardt fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p21-p13) (Kaplan J *et al.*, 1994). Más tarde se pudo identificar el gen responsable de la enfermedad *ABCR* (*retina-specific ABC transporter*), y se denominó *ABCA4* (*ATP binding cassette [ABC] transporter*; Allikmets R *et al.*, 1997a). Este gen consta de 50 exones que se traducen en su totalidad. Tiene una pauta abierta de lectura de 6.819 pares de bases que generan un polipéptido de 2.273 aminoácidos, denominado RmP (*Rim protein*).

También se han descrito formas dominantes de la enfermedad (*Stargardt-like disease*), cuyos genes responsables se encuentran localizados en los cromosomas 4 (*STGD4*, Kniazeva *et al.*, 1999), 6 (*STGD3*, *ELOVL4*, Stone *et al.*, 1994; Zhang K *et al.*, 1994) y 13 (*STGD2*; Zhang K *et al.*, 1994).

7.4- VARIANTES ALÉLICAS DE ABCA4

Las mutaciones en *ABCA4* se han asociado además de con la enfermedad de Stargardt, con otras distrofias de retina que incluyen:

- Distrofia de Conos y Bastones autosómica recesiva (*arDCB*) (Cremers FP *et al.*, 1998)
- Retinosis Pigmentaria autosómica recesiva (*arRP*) (Martinez-Mir A *et al.*, 1998)
- Degeneración macular asociada a la edad (*DMAE*) (Allikmets R *et al.*, 1997).

Para poder explicar los diferentes fenotipos oftalmológicos que las mutaciones en el gen *ABCA4* producen, los investigadores propusieron un modelo que explica la severidad de la enfermedad dependiendo de la actividad residual de la proteína RmP (Maugeri *et al.*, 1999).

De modo que los alelos mutantes de ABCA4 se pueden clasificar en “suaves”, “moderados” y “graves” y dependiendo de la combinación de estos darán lugar a un fenotipo diferente:

- STGD, si los pacientes poseen dos alelos “suaves” o la combinación de un alelo “suave” con uno “grave” ya que conservan cierta actividad residual de la proteína
- Los pacientes con dos alelos “graves” o la combinación de un alelo “grave” y otro “moderado”, desarrollarán DCB o RP, fenotipos más graves debido a que la actividad residual de la proteína es muy reducida.
- Por último, aquellos pacientes portadores de un solo alelo mutante y un alelo sano tienen un elevado riesgo de desarrollar DMAE.

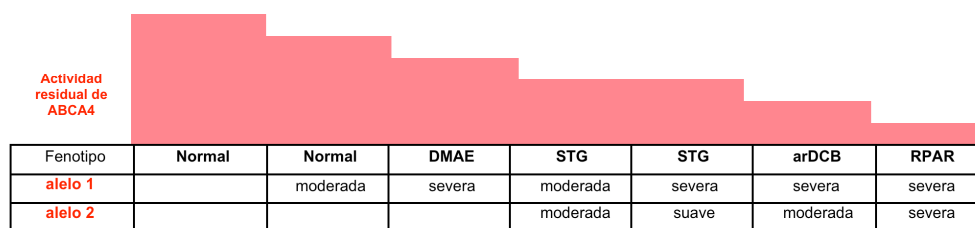


Figura 1.15. En este gráfico se representa la relación inversamente proporcional que existe entre la severidad de la mutación y la actividad residual de la proteína RmP (Maugeri *et al.*, 1999).

Hasta el momento, se han identificado aproximadamente 500 cambios en el gen *ABCA4* por lo que quizá se trate del gen más polimórfico implicado en distrofias de retina (Lewis RA *et al.*, 1999; Rivera A *et al.*, 2000). Se han descrito desde mutaciones puntuales a delecciones de varios exones (www.hgmd.org). La mayoría de los cambios reportados son mutaciones que provocan cambio de aminoácido (Briggs CE *et al.*, 2001). Los alelos causantes de enfermedad suponen entre el 66% y el

80% de los cromosomas asociados a Stargardt estudiados (Shroyer NF *et al.*, 2001). Algunas de estas mutaciones se han encontrado en elevada frecuencia en determinadas poblaciones de Europa y Estados Unidos.

7.4.1- FENOTIPOS ASOCIADOS AL GEN ABCA4

Enfermedad de Stargardt (ver págs. 32-33)

Distrofia de conos y bastones (DCB)

Los pacientes que poseen DCB se caracterizan por presentar una visión central disminuída o borrosa, sin llegar a presentar ceguera nocturna. El fondo de ojo se caracteriza por presentar alteraciones granulares en el EPR, que se denomina más comúnmente como mácula en “*ojo de buey*”, pudiendo existir o no cierta afectación de la retina periférica. El campo visual presenta escotoma central, mientras que el campo periférico es normal o muestra una constricción moderada. La prueba oftalmológica del ERG puede mostrar una respuesta de conos reducida o abolida, en comparación con la respuesta menos alterada de los bastones, o puede reflejar una alteración por igual en ambos sistemas de fotorreceptores.

Retinosis Pigmentaria (RP)

Los pacientes que presentan una RP se caracterizan por tener una afectación binocular con ceguera nocturna (hemeralopia), una reducción concéntrica del campo visual (“*visión en túnel*”, “*visión en cañón de escopeta*”) y una pigmentación periférica del fondo del ojo con aspecto en espículas óseas u *osteoclastos* (Birch DG *et al.*, 1999).

Distrofia macular asociada a la edad (DMAE)

Es la primera causa de pérdida severa de visión entre la población de edad avanzada en el mundo occidental (Allikmets *et al.*, 1997). Es una enfermedad multifactorial, en la que interviene un componente ambiental (tabaco, dieta, nivel de colesterol) y un componente genético (un alelo mutante en gen *ABCA4*, polimorfismos en el gen del factor H del complemento; ambos en el cromosoma 1). Aunque en estos momentos, el papel del gen *ABCA4* en DMAE está bajo discusión.

Por lo general, afecta a personas mayores de cincuenta años, aunque la incidencia aumenta considerablemente a partir de los setenta años de edad. Se estima que un 30% de la población de esta franja de edad padece alguna forma previa de la enfermedad, denominada MAE (Maculopatía asociada a la edad), que produce alteraciones -percepción de manchas por la mañana, cuando el ojo se ha acostumbrado a la oscuridad del sueño-, debido a la acumulación de *drusas* en la retina. Puede que el proceso se detenga en esta fase o que evolucione hacia una de las dos formas de DMAE:

- forma húmeda: se produce de manera repentina, por la formación de neovasos;
- forma seca: se produce una evolución más lenta y progresiva, en la que las drusas se van fundiendo y forman zonas de atrofia (Klevering *et al.*, 2004).

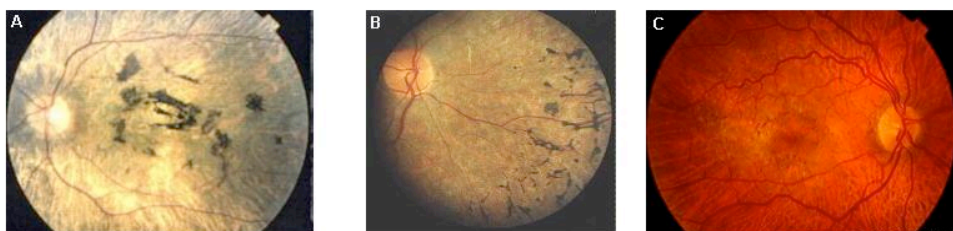


Figura 1.16. Fondos de ojo correspondientes a los distintos fenotipos producidos por mutaciones en *ABCA4*, además de la STGD: A) Distrofia de conos y bastones; B) Retinosis Pigmentaria; C) Distrofia Macular Asociada a la Edad.

8. APROXIMACIONES TERAPEUTICAS

8.1- TERAPIA GÉNICA

La terapia génica consiste en la inserción de genes en las células de los tejidos de un individuo para tratar una enfermedad en general, y enfermedades hereditarias en particular.

Evidentemente, la terapia génica como opción terapéutica implica conocer primeramente la mutación o mutaciones que producen la enfermedad.

El procedimiento consiste en introducir una copia funcional normal de un gen defectivo o ausente en el genoma de un individuo con el objetivo de restaurar la función normal de la célula y así eliminar los síntomas de la enfermedad. Un portador llamado vector se utiliza para entregar el gen terapéutico a las células diana del paciente. Actualmente, el tipo más común de vector son virus que genéticamente se han alterado para llevar el ADN normal del ser humano. Los virus han desarrollado formas de encapsular y entregar sus genes a las células humanas de un modo patógeno. Los científicos han intentado reproducir esta capacidad manipulando el genoma viral para quitar los genes causantes de la enfermedad e insertar los terapéuticos (Carter BJ, 2005; Warrington KH Jr. & Herzog RW, 2006)

Respecto a las distrofias de retina, consistiría, básicamente, en una inyección subretiniana en la que a través de un virus adenoasociado que hace de vehículo, se introduzca el gen modificado que sustituye al mutado. Los virus adenoasociados presentan una limitación y es la capacidad de carga, restringida a 4,7 kb de genoma. Recientemente se ha demostrado en ratones que un vector adenovirus adenoasociado del serotipo 5 (AAV5) es capaz de incorporar hasta 8,9 kb, por lo que gracias a este tipo de vectores es posible el empaquetamiento de genes grandes como es el

caso del gen *ABCA4* (Alloca M *et al.* 2008). Tanto en este estudio como en otros en los que se se inyectan vectores lentivirales (Kong J *et al.* 2008) en ratones *Abca4*^{-/-}, se observó una disminución de acúmulos de lipofucsina, recuperando la funcionalidad de los fotorreceptores.

8.2- TECNOLOGÍA DE CÉLULAS ENCAPSULADAS

Uno de los mayores retos del tratamiento de las enfermedades de la retina ha sido la capacidad de administrar medicamentos terapéuticos directamente en la misma retina.

Se ha desarrollado una tecnología que permite una administración controlada y continua de un neuroprotector llamado CNTF (factor neurotrófico ciliar) con el objetivo de frenar la degeneración celular de los fotorreceptores. Para beneficiarse de este tipo de terapia es necesario una porción suficiente de retina activa para que el factor neurotrófico pueda tener un efecto de rescate celular.

Por otro lado, estudios recientes (Maeda T *et al.* 2009) han evaluado la eficacia terapéutica de un inhibidor del ciclo retinoides (retinilamina) en ratones con ausencia de actividad de *Abca4* y retinal deshidrogenasa 8 (*Rdh8*), en los cuales se observa una degeneración retiniana atenuada.

8.3- REMODELACIÓN DE LA RETINA EN MODELOS ANIMALES

Se han realizado estudios sobre la evolución de la degeneración de la retina en ratas con mutaciones tanto en genes que se expresan en los fotorreceptores como en células del epitelio pigmentario para obtener información sobre la reestructuración de la retina que fuese útil a la hora de aplicar futuros tratamientos. Estos estudios demostraron que tras la muerte de los fotorreceptores se produce una remodelación de los circuitos

retinianos, ya que aquellas células que pierden sus contactos buscan otras células con las que establecer nuevas conexiones sinápticas (Cuenca N *et al.*, 2004; Cuenca N *et al.*, 2005) abriendo una puerta a las terapias con trasplantes, de esta manera las células madre serían factibles como tratamiento.

El proceso de degeneración que se ha estudiado se produce en 3 fases:

- Fase 1: los fotorreceptores sufren un periodo de estrés, en el que se produce la desorganización de sus contactos sinápticos;
- Fase 2: se produce la muerte gradual de los fotorreceptores y puede iniciarse la muerte de alguna neurona retiniana.
- Fase 3: las células neuronales mueren progresivamente, incluyendo las células ganglionares, y las células de Müller rellenan los espacios dejados por éstas. Las células del epitelio pigmentario migran e invaden la retina. Se produce la remodelación de la retina.

El conocimiento de la progresión de la enfermedad es importante a la hora de decidir el tipo de terapia a realizar y también el momento idóneo para realizarla.

Si la enfermedad se encuentra en fase 1 y 2 se podrán utilizar estrategias para ralentizar la degeneración como son la inyección de factores neurotróficos, células encapsuladas o estrategias para curar la enfermedad, como son los trasplantes retinianos y la terapia génica. Sin embargo, si la degeneración se encuentra en fase 3 se podrán utilizar trasplantes retinianos incluyendo células madre y visión artificial.

8.4- RETINA ARTIFICIAL

Consiste en la implantación de microchips ASR (**Artificial Silicon Retina**) en los ojos de los pacientes. El chip se compone de 5.000 células microscópicas de energía solar que convierten la luz en impulsos

eléctricos. El propósito del chip consiste en reemplazar a los fotorreceptores dañados.

8.5- CÉLULAS MADRE

Una célula madre es una célula que tiene la capacidad de *autorenovarse* mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que está programada y, por lo tanto, producir células de uno o más tejidos maduros, funcionales y diferenciados en función de su grado de *multipotencialidad*. Las células madre embrionarias son aquellas que forman parte de la masa celular interna de un embrión de 4-5 días de edad y que tienen la capacidad de formar todos los tipos celulares de un organismo adulto.

En el contexto de la actual investigación, se pretende obtener células madre que se mantengan como tales en cultivo en el laboratorio y que, bajo determinados estímulos, puedan conducir a poblaciones de células diferenciadas, como células óseas, musculares u oculares. Esta capacidad para diferenciarse ofrece un potencial terapéutico para el tratamiento de las enfermedades degenerativas de la retina.

II. Objetivos

II. OBJETIVOS

Las distrofias hereditarias de retina son un conjunto de enfermedades oftalmológicas degenerativas y generalmente progresivas, muy heterogéneo, tanto genética como clínicamente, que hasta el momento no tienen tratamiento, por lo que la caracterización molecular resulta fundamental.

Este trabajo pretende profundizar en las bases genéticas y moleculares de la Enfermedad de Stargardt y sus formas asociadas con la incorporación de nuevas técnicas de cribado que nos permitan identificar el defecto genético causante de la enfermedad de la forma más eficaz y eficiente posible.

Según estas ideas los objetivos planteados en este trabajo fueron los siguientes:

1. Valoración de nuevas tecnologías de cribado mutacional para la caracterización molecular de la Enfermedad de Stargardt y formas asociadas:
 - Microarray de genotipado
 - dHPLC (*denaturing High Performance Liquid Chromatography*)
 - HRM (*High Resolution Melting*)
 - MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)
2. Segregación familiar de las mutaciones en el gen *ABCA4* en las familias incluidas en este estudio y análisis de los haplotipos.

3. Diseño del algoritmo diagnóstico más eficaz y eficiente para los pacientes clínicamente diagnosticados de Enfermedad de Stargardt y formas asociadas.
4. Establecer una correlación genotipo-fenotipo.

III. Pacientes y Métodos

III. PACIENTES Y MÉTODOS

1- PACIENTES Y FAMILIAS ESTUDIADAS

1.1- PROCEDENCIA DE LOS PACIENTES

El reclutamiento de pacientes con STGD, DCB y RP y sus respectivos familiares que han participado en este estudio fue revisado y aprobado por el comité de ética del Hospital Fundación Jiménez Díaz.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes que participaron en el estudio, de acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki (www.wma.net).

1.2- EVALUACIÓN CLÍNICA

Los pacientes fueron diagnosticados por oftalmólogos y genetistas experimentados. Normalmente, se le entrega un cuestionario al paciente, en el cual se recogen datos personales y familiares, así como el registro de cuando comenzó a padecer los primeros síntomas y de cuales fueron éstos.

La información obtenida en la consulta, los datos recogidos en el cuestionario y los exámenes oftalmológicos nos serán de gran ayuda para elaborar una historia clínica completa y orientar el estudio del gen responsable de su enfermedad.

1.3- CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS FAMILIAS ESTUDIADAS

El estudio clínico y molecular se ha realizado en un total de 209 familias, de las cuales, 127 fueron diagnosticadas de STGD, 46 de DCB,

36 de RPAR. Estas familias se clasificaron de acuerdo con los siguientes criterios clínicos:

- Los pacientes con Enfermedad de Stargardt se caracterizan por presentar los siguientes criterios oftalmológicos: pérdida de la visión central, reducción de la agudeza visual a una edad temprana, pérdida del reflejo foveal, apariencia granular de fovea, estrías alrededor de la lesión macular, atrofia coroidal en el centro de la retina, esclerosis de vasos coroidales y aparición de acúmulos de lipofucsina que se depositan hacia el polo posterior del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Cuando los acúmulos de pigmento se localizan hacia el polo posterior de la retina, se denomina Fundus flavimaculatus.
- El diagnóstico de distrofia de conos y bastones se basa en los siguientes criterios: pérdida de la visión central sin historia de ceguera nocturna, severa reducción de la agudeza visual (20/100 que empeora con la edad) y alteración de la visión de los colores. Los hallazgos funduscópicos muestran degeneración macular, alteraciones en la retina periférica que incluyen acúmulos de pigmento o afinamiento del epitelio pigmentario. La disminución de la respuesta del ERG se produce primero en los conos y posteriormente en los bastones.
- La Retinosis Pigmentaria se diagnostica en pacientes que desarrollan: ceguera nocturna a una edad temprana con reducción progresiva y concéntrica del campo visual. El fondo de ojo presenta vasos retinianos disminuidos, despigmentación del EPR, pigmento en forma de osteoclastos (espículas óseas) y palidez papilar. La respuesta del ERG disminuye en los bastones y posteriormente en los conos, llegando a estar abolida en la etapa final de la enfermedad (Birch DG *et al.*, 1999; Klevering BJ *et al.*, 2004).

En la siguiente tabla se representa el gen implicado y las familias estudiadas clasificadas según el fenotipo asociado:

| Gen estudiado | Diagnóstico clínico | Nº de familias | Nº de pacientes |
|----------------------|---|-----------------------|------------------------|
| <i>ABCA4</i> | Enfermedad de Stargardt | 127 | 148 |
| | Distrofia de conos y bastones | 46 | 59 |
| | Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva | 36 | 45 |
| | Total de familias estudiadas | 209 | 252 |

Tabla 3.1. Clasificación de las familias estudiadas según el fenotipo.

- Gen *ABCA4*: Distrofias Maculares Autosómicas Recesivas (STGD y DCB), Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva.

- Enfermedad de Stargardt (STGD):

De las 127 familias estudiadas diagnosticadas de Enfermedad de Stargardt, 17 de ellas pertenecen a un estudio previo, la mayoría de las cuales se identificó un alelo o ningún alelo mutado, son las siguientes: ARDM-65, ARDM-67, ARDM-75, ARDM-83, ARDM-84, ARDM-122, ARDM-125, ARDM-135, ARDM-146, ARDM-158, ARDM-160, ARDM-162, ARDM-163, ARDM-164, ARDM-165, ARDM-167, RP-773.

Las 110 familias restantes se detallan a continuación: ARDM-166, ARDM-170, ARDM-173, ARDM-178, ARDM-179, ARDM-181, ARDM-182, ARDM-183, ARDM-186, ARDM-187, ARDM-191, ARDM-193, ARDM-194, ARDM-196, ARDM-197, ARDM-200, ARDM-203, ARDM-204, ARDM-205, ARDM-207, ARDM-208, ARDM-209, ARDM-211, ARDM-213, ARDM-215, ARDM-

216, ARDM-218, ARDM-222, ARDM-223, ARDM-225, ARDM-226, ARDM-227, ARDM-236, ARDM-238, ARDM-240, ARDM-242, ARDM-243, ARDM-244, ARDM-245, ARDM-246, ARDM-248, ARDM-249, ARDM-252, ARDM-254, ARDM-255, ARDM-257, ARDM-258, ARDM-259, ARDM-260, ARDM-261, ARDM-262, ARDM-264, ARDM-265, ARDM-266, ARDM-267, ARDM-269, ARDM-270, ARDM-272, ARDM-273, ARDM-277, ARDM-278, ARDM-279, ARDM-280, ARDM-281, ARDM-283, ARDM-284, ARDM-285, ARDM-286, ARDM-287, ARDM-288, ARDM-291, ARDM-295, ARDM-296, ARDM-297, ARDM-298, ARDM-300, ARDM-301, ARDM-304, ARDM-305, ARDM-307, ARDM-308, ARDM-310, ARDM-312, ARDM-313, ARDM-315, ARDM-316, ARDM-317, ARDM-318, ARDM-323, ARDM-324, ARDM-325, ARDM-326, ARDM-329, ARDM-330, ARDM-331, ARDM-334, ARDM-335, ARDM-340, ARDM-341, ARDM-342, ARDM-345, ARDM-349, ARDM-350, ARDM-351, ARDM-352, ARDM-353, ARDM-354, ARDM-359, ARDM-360, ARDM-361.

- Distrofia de conos y bastones (DCB):

De las 46 familias estudiadas diagnosticadas de Distrofia de conos y bastones, 10 pertenecen al mismo estudio previo que hemos hecho referencia anteriormente, y son: ARDM-49, ARDM-99, ARDM-100, ARDM-131, ARDM-142, ARDM-174, RP-577, RP-763, RP-964, RP-959.

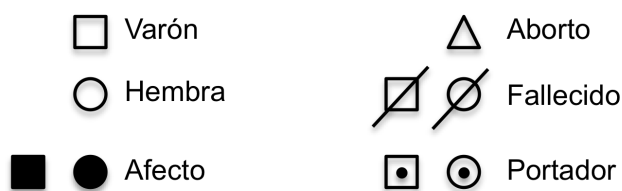
El resto de familias son: ARDM-177, ARDM-190, ARDM-195, ARDM-198, ARDM-206, ARDM-212, ARDM-214, ARDM-224, ARDM-247, ARDM-290, ARDM-292, ARDM-299, ARDM-302, ARDM-309, ARDM-327, ARDM-336, RP-298, RP-532, RP-657, RP-741, RP-766, RP-828, RP-870, RP-927, RP-998, RP-1058, RP-1126, RP-1175, RP-1177, RP-1205, RP-1222, RP-1266, RP-1295, RP-1307, RP-1353, RP-1354.

- Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva (RPAR):

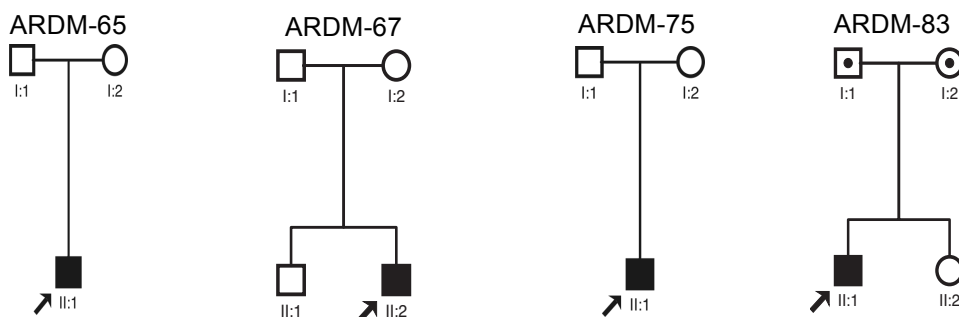
De las 36 familias estudiadas con Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva, 5 se estudiaron anteriormente y son: RP-716, RP-775, RP-818, RP-834, RP-854.

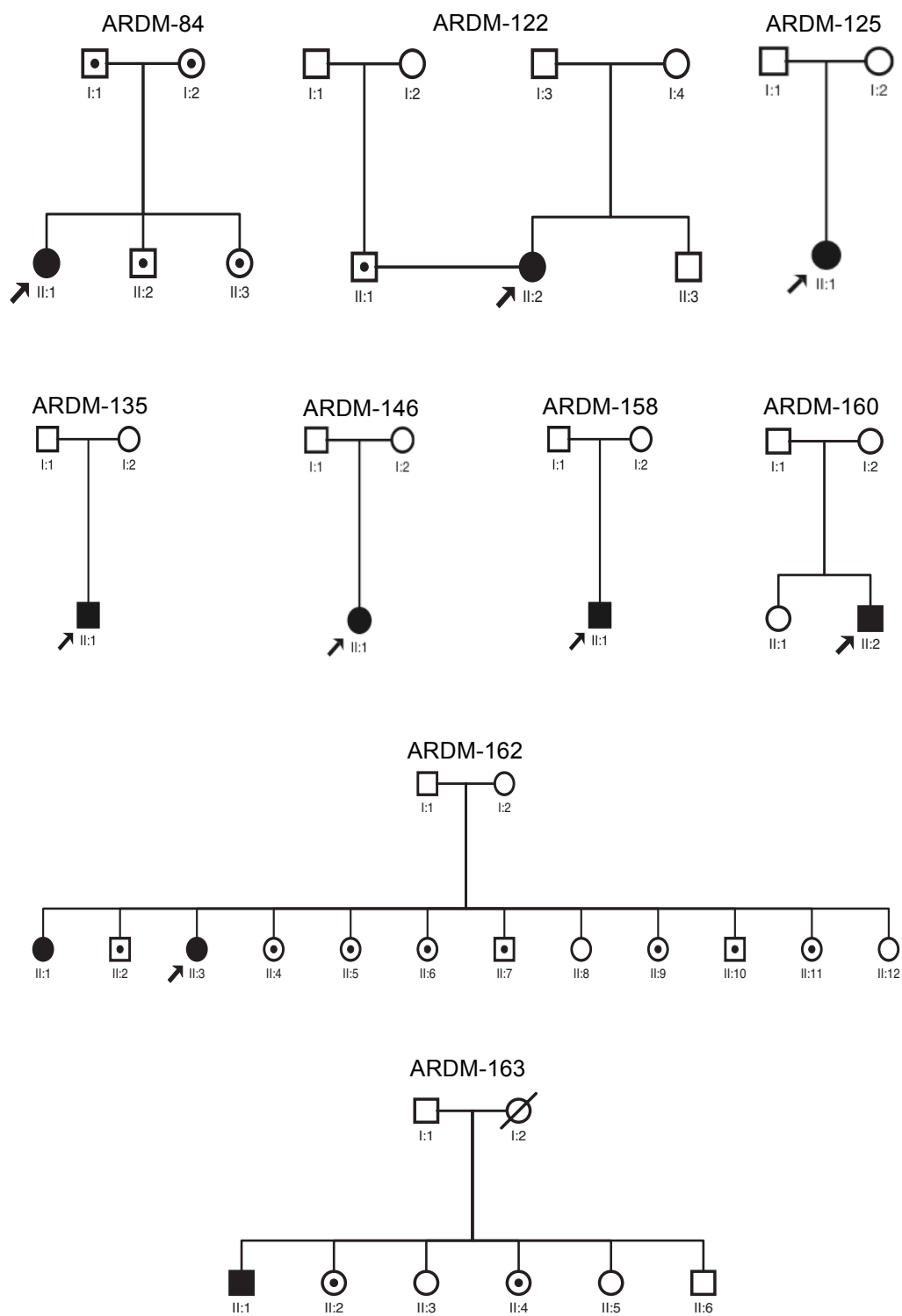
El resto de familias pertenecen a este nuevo trabajo: RP-3, RP-12, RP-17, RP-137, RP-160, RP-180, RP-181, RP-201, RP-231, RP-260, RP-261, RP-285, RP-289, RP-341, RP-398, RP-407, RP-503, RP-643, RP-682, RP-687, RP-757, RP-759, RP-888, RP-904, RP-942, RP-1000, RP-1174, RP-1191, RP-1231, RP-1280, RP-1291.

Los árboles genealógicos de las familias estudiadas en este trabajo se muestran a continuación, siendo:



Familias con Distrofia Macular Autosómica Recesiva -Enfermedad de Stargardt-





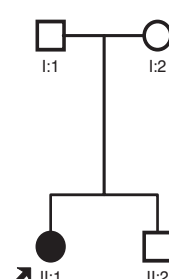
ARDM-164



ARDM-165



ARDM-166



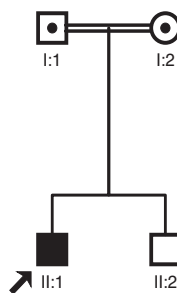
ARDM-167



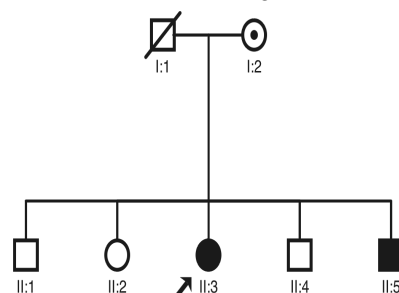
RP-773



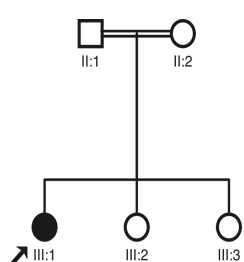
ARDM-170



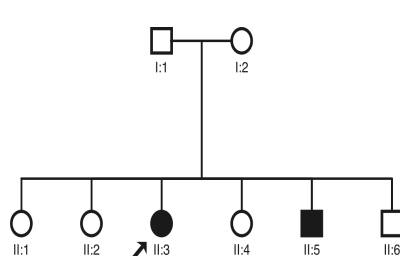
ARDM-173



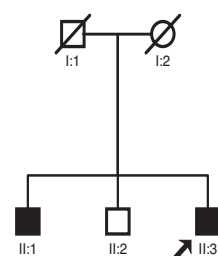
ARDM-177

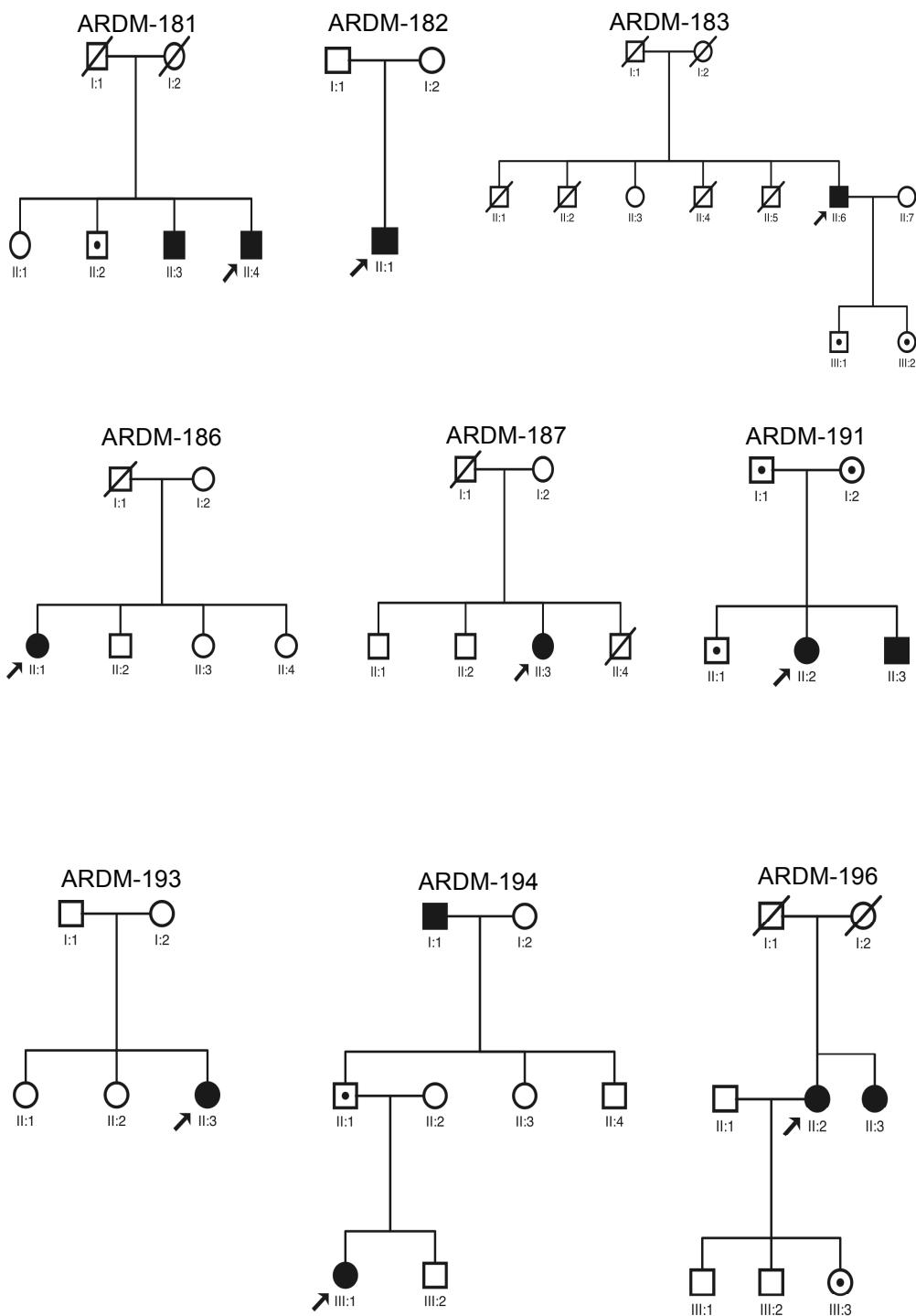


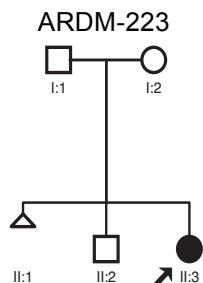
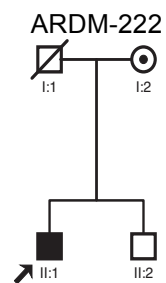
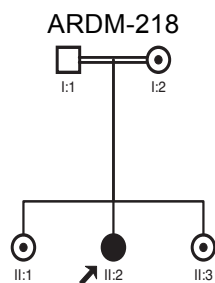
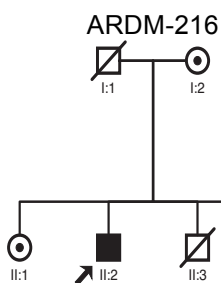
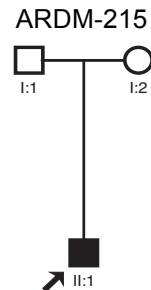
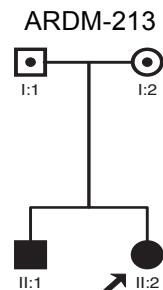
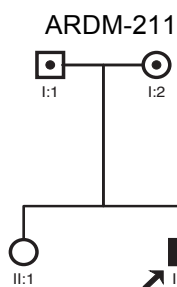
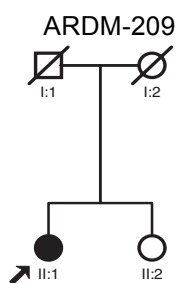
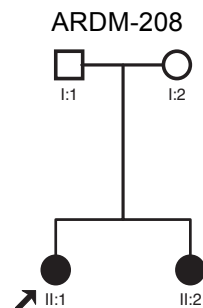
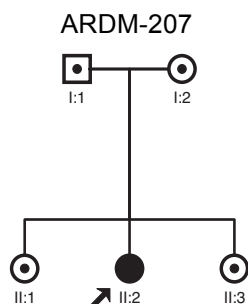
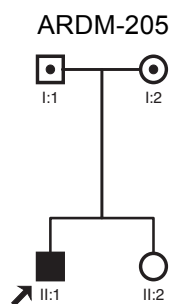
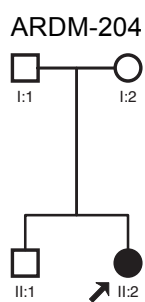
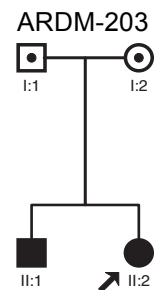
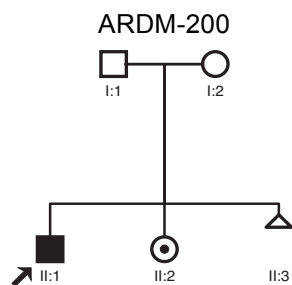
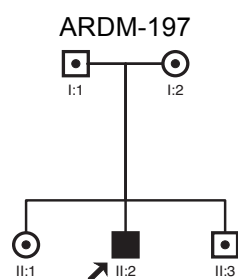
ARDM-178

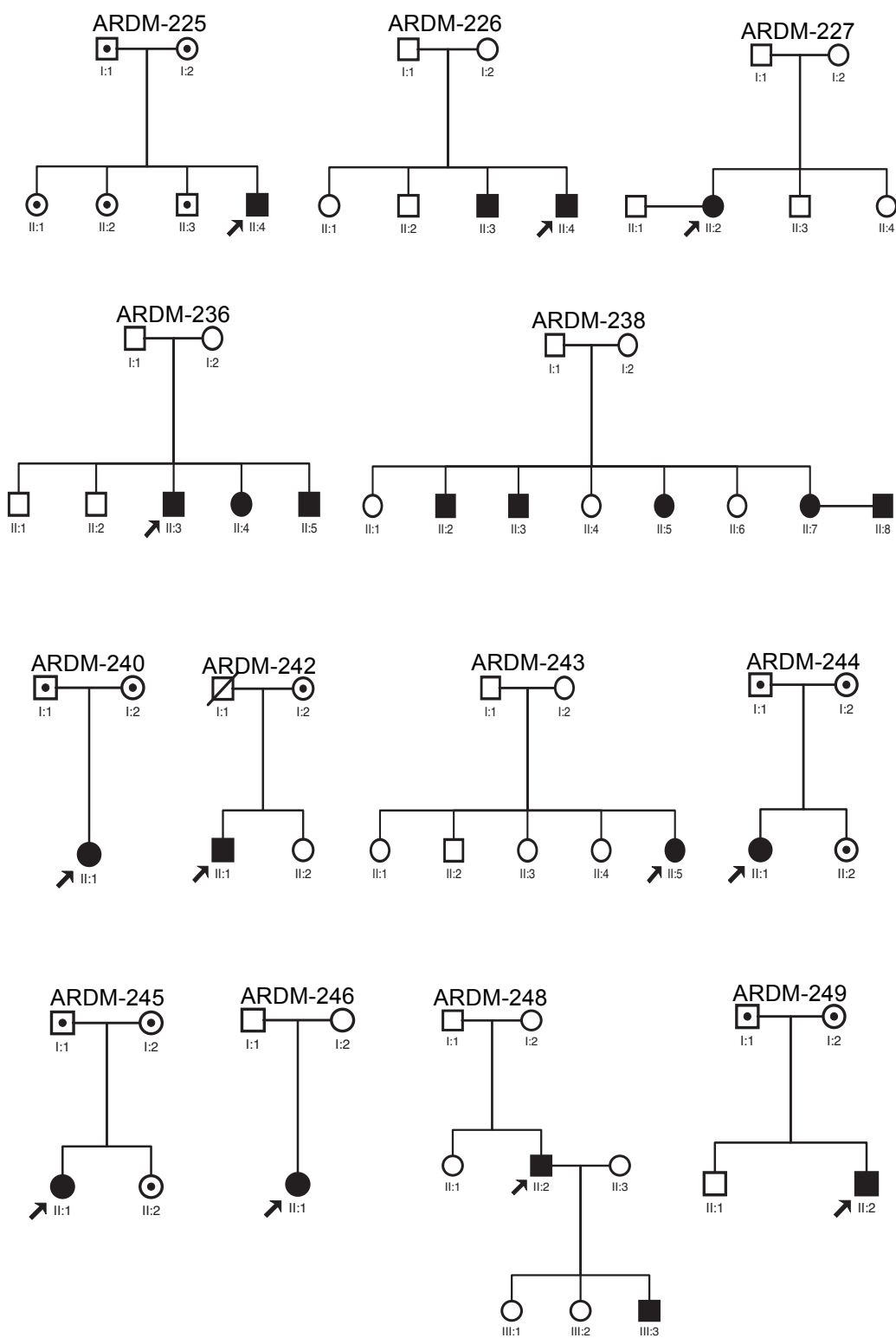


ARDM-179

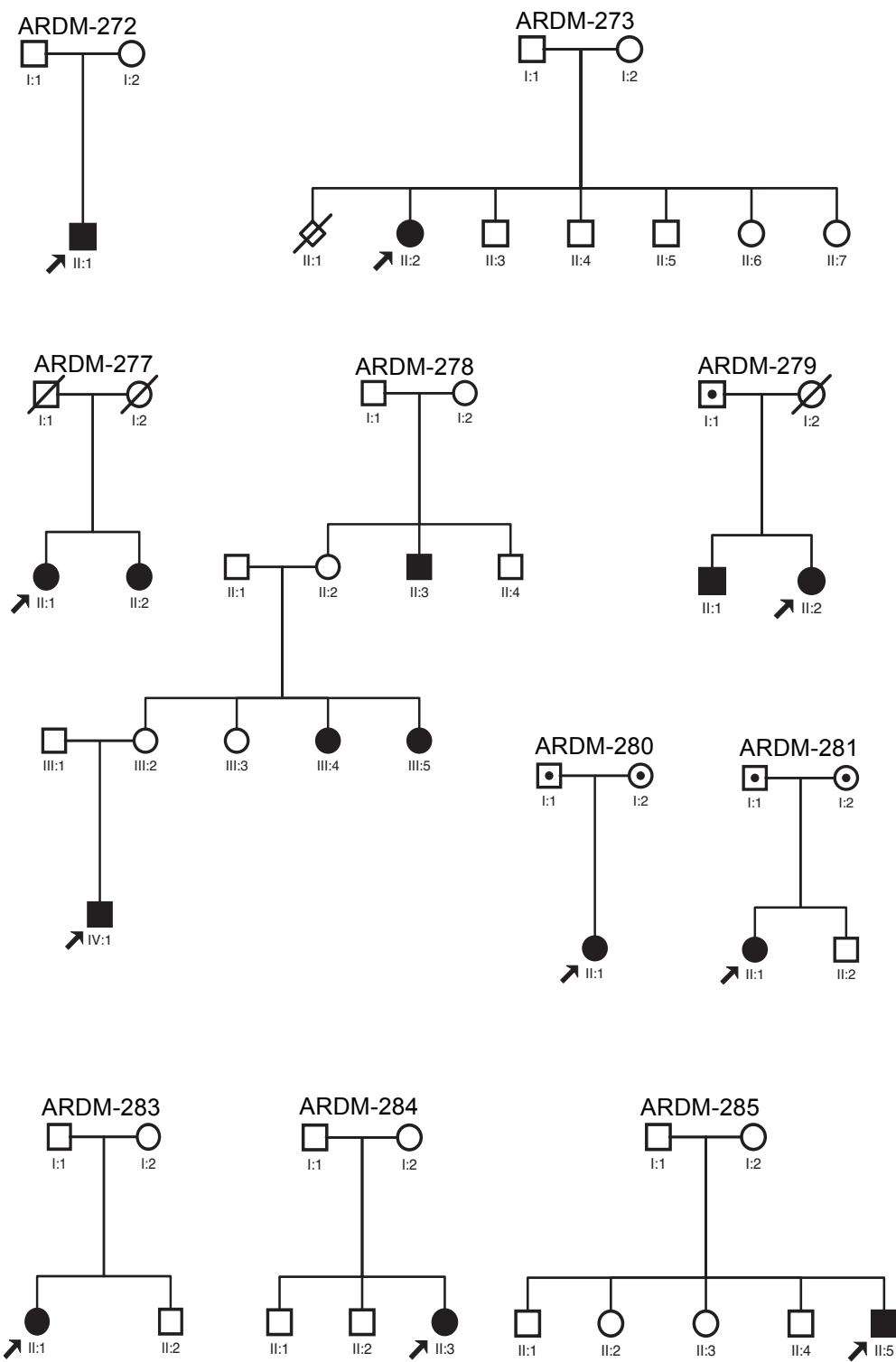


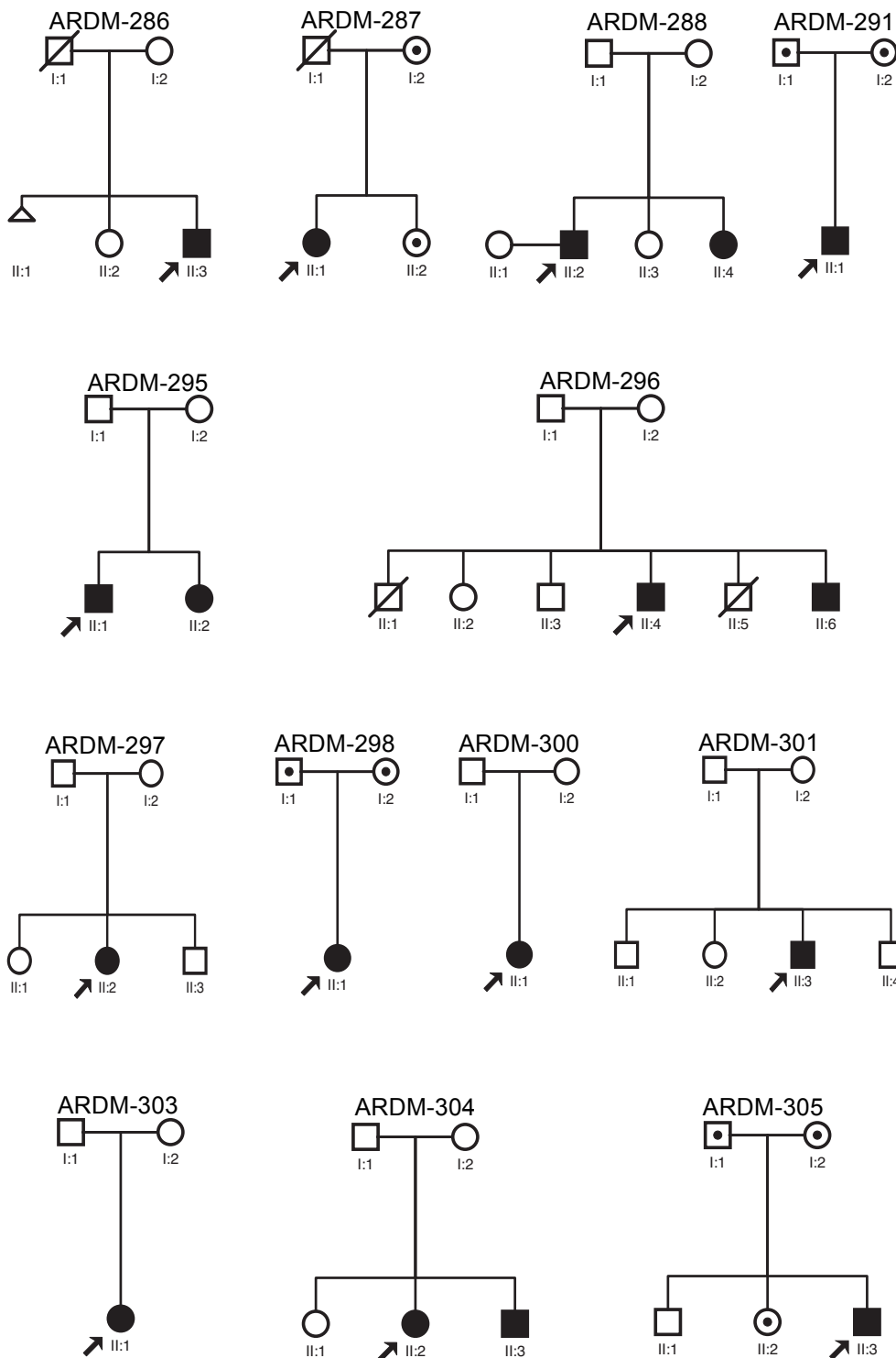


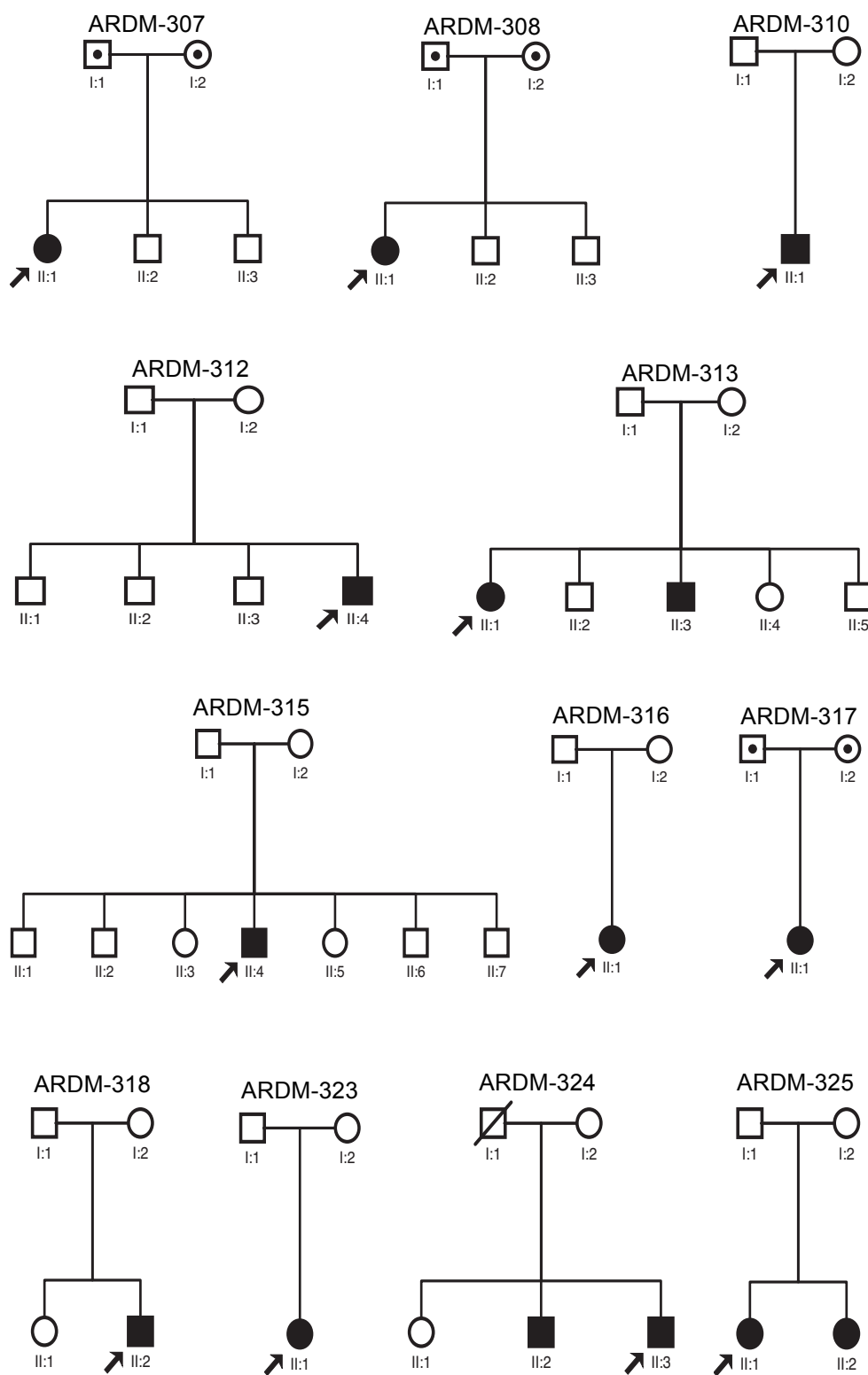


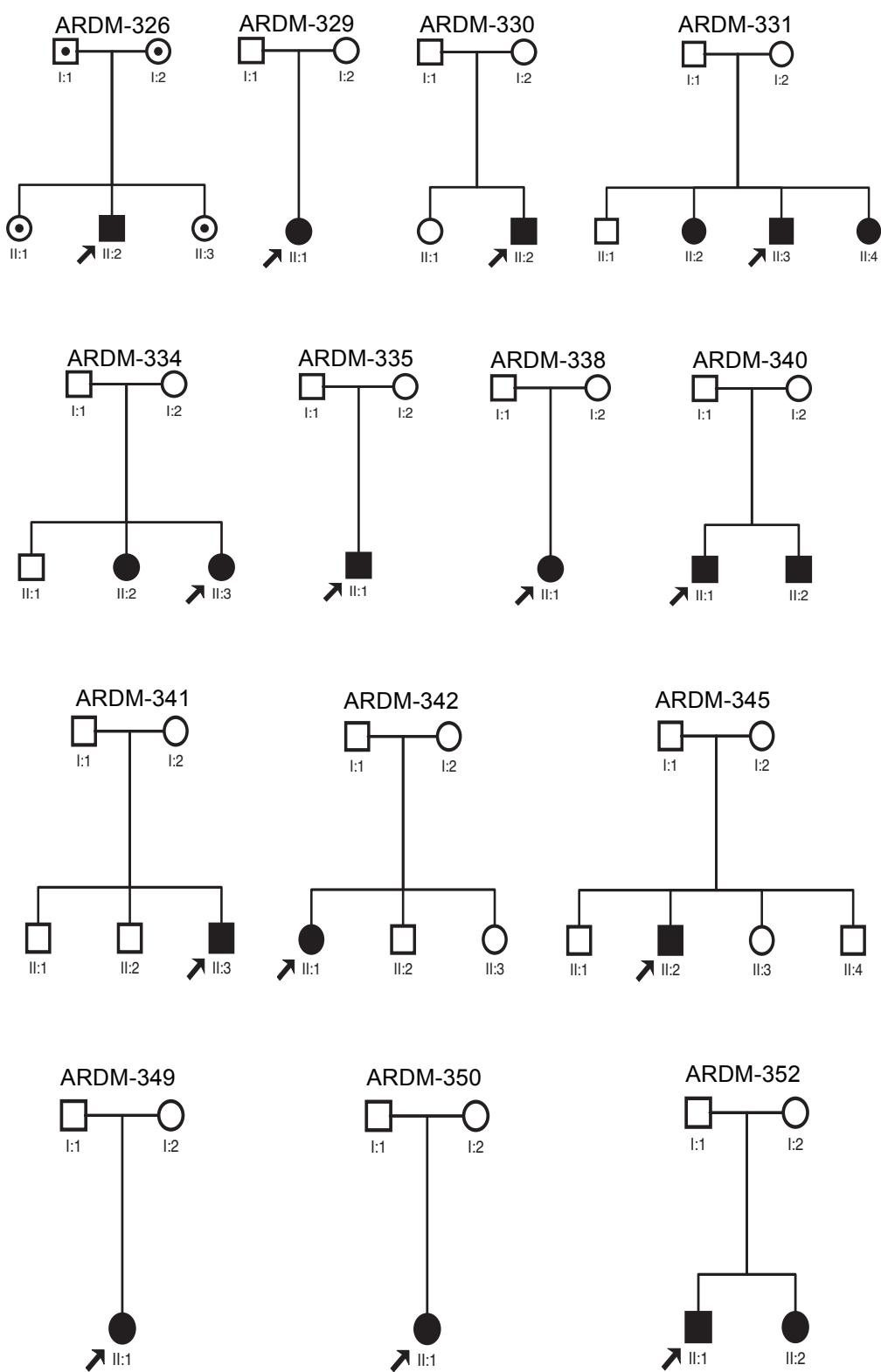


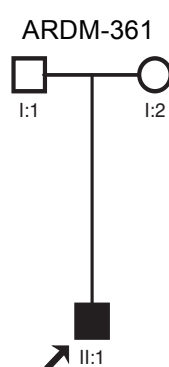
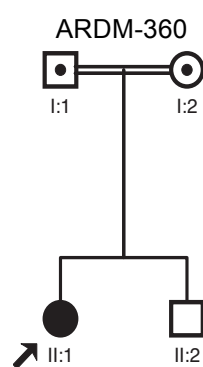
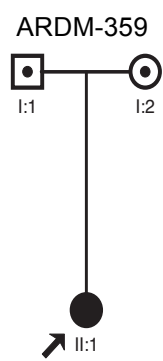
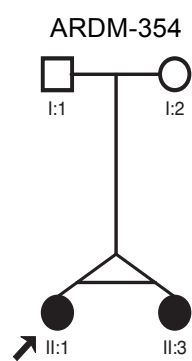
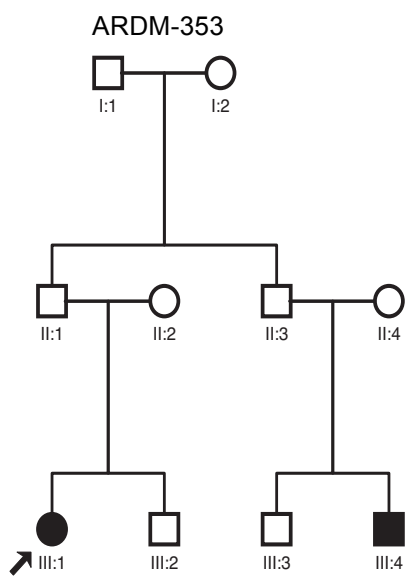


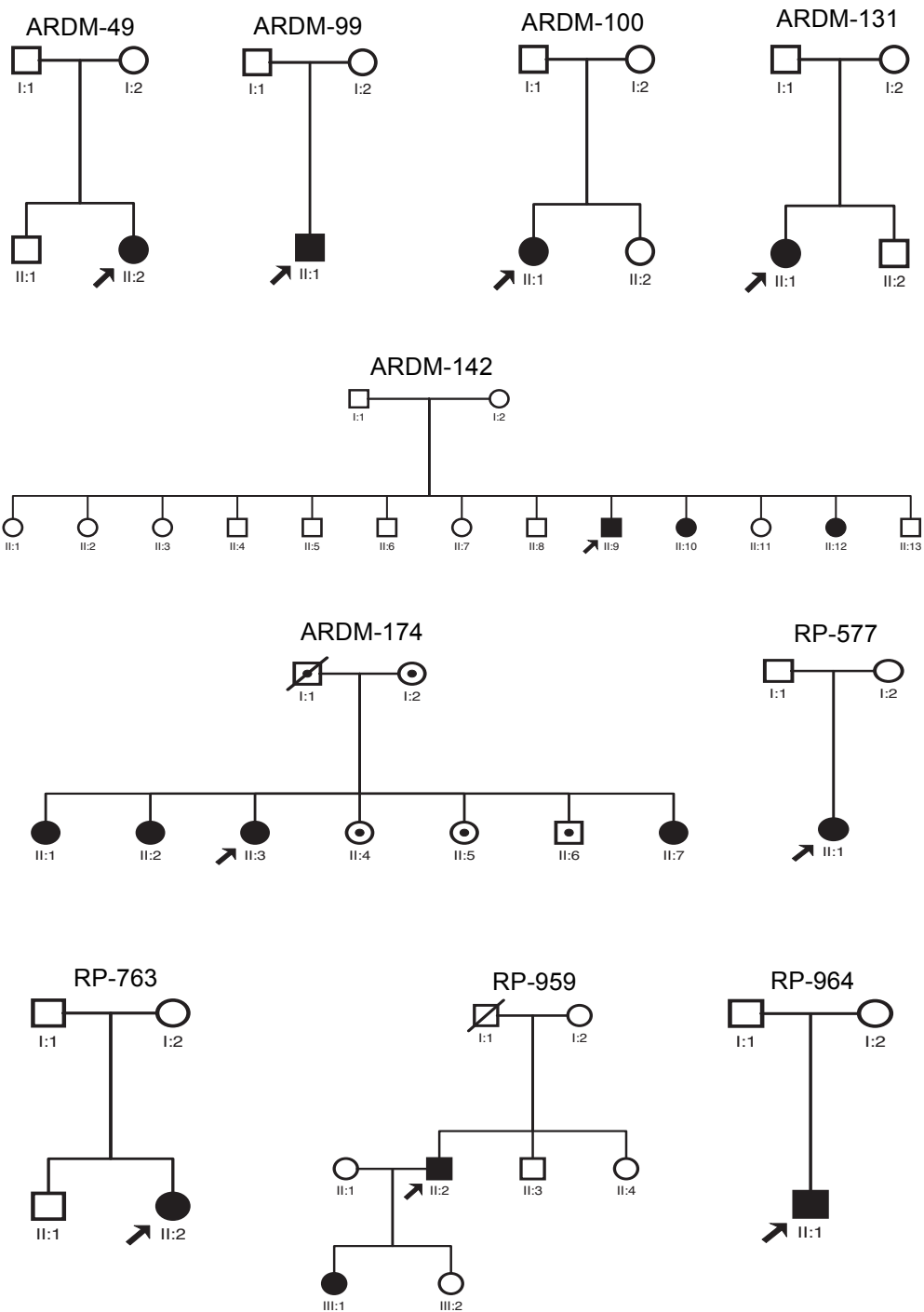


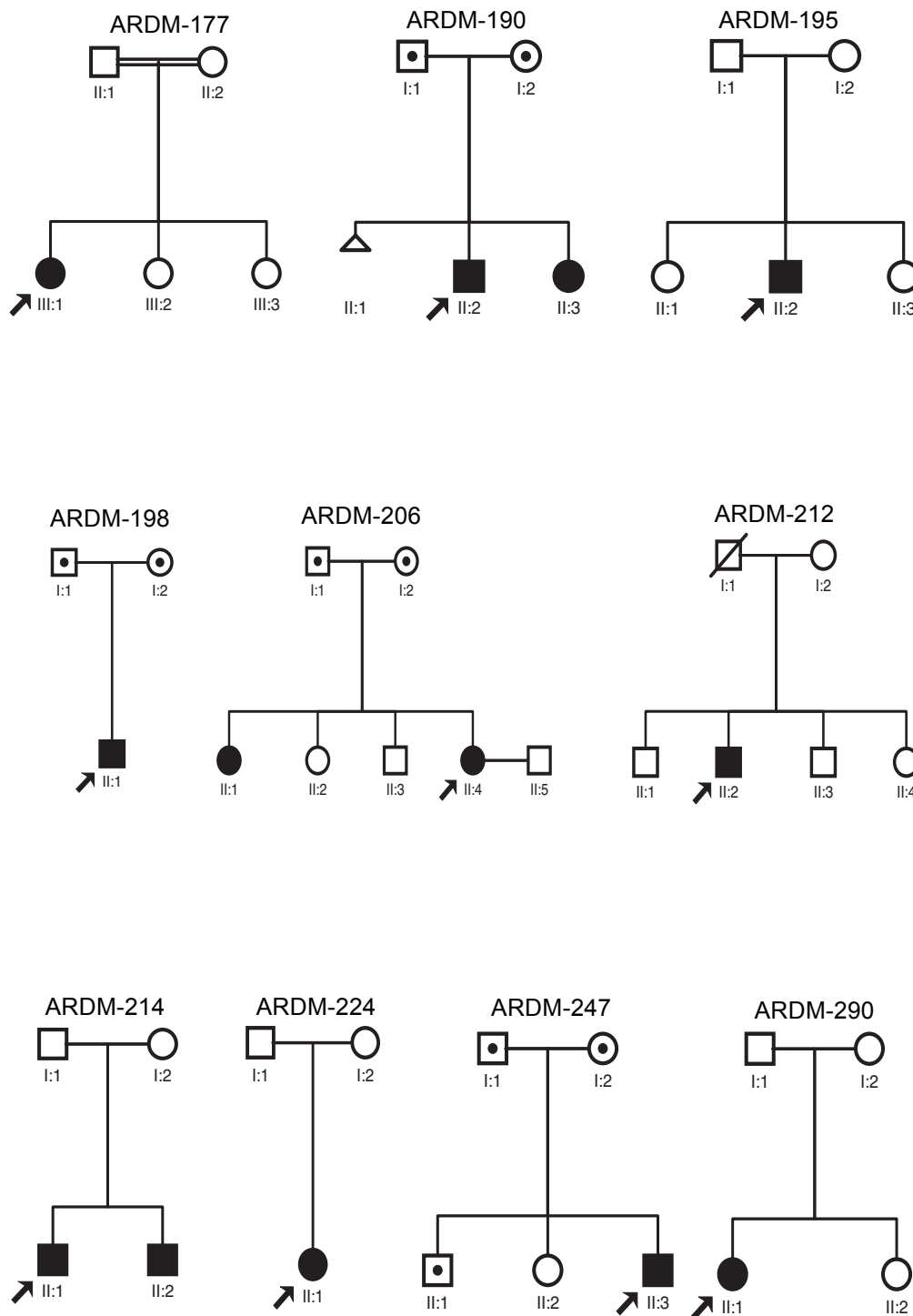


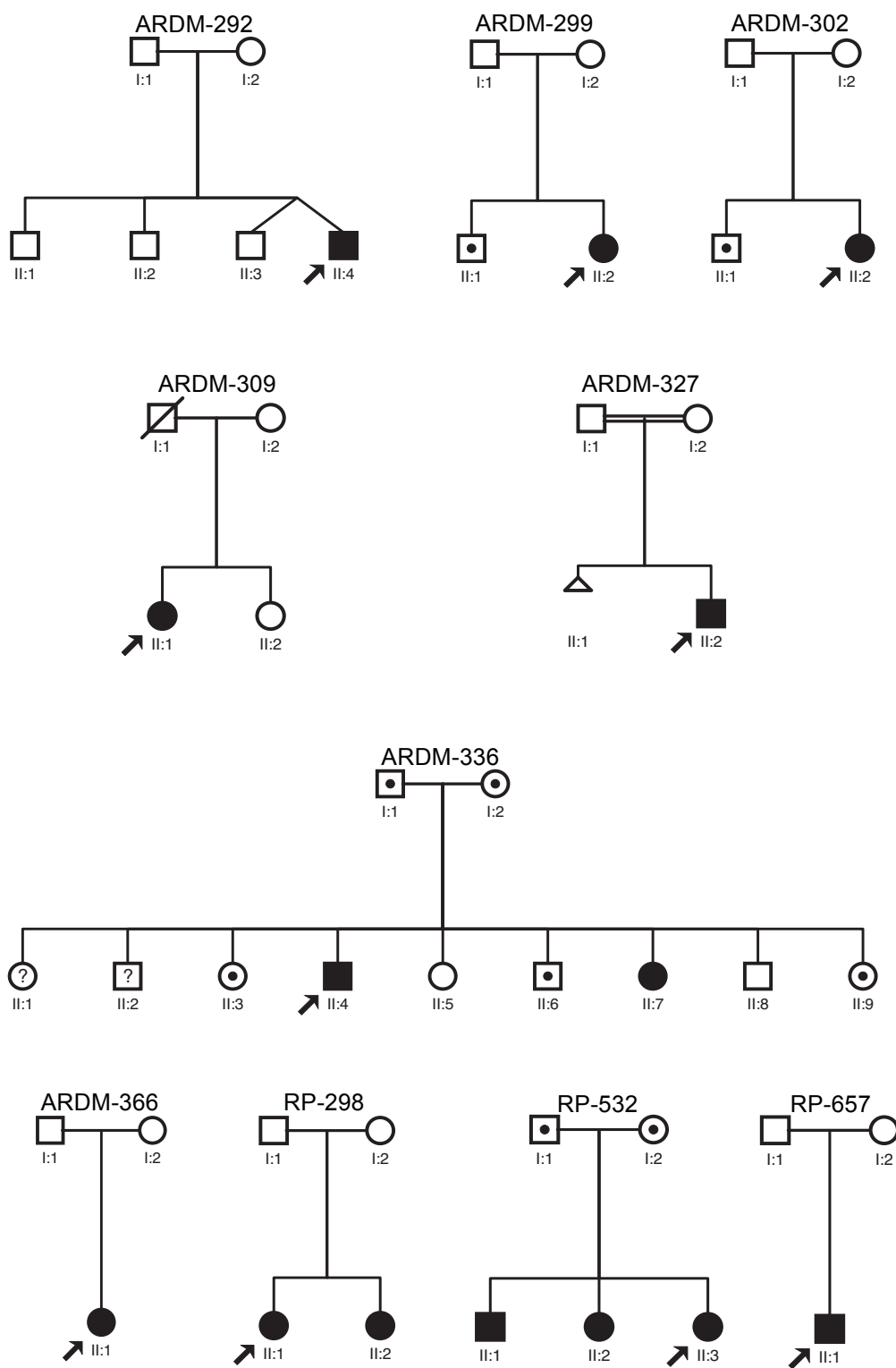


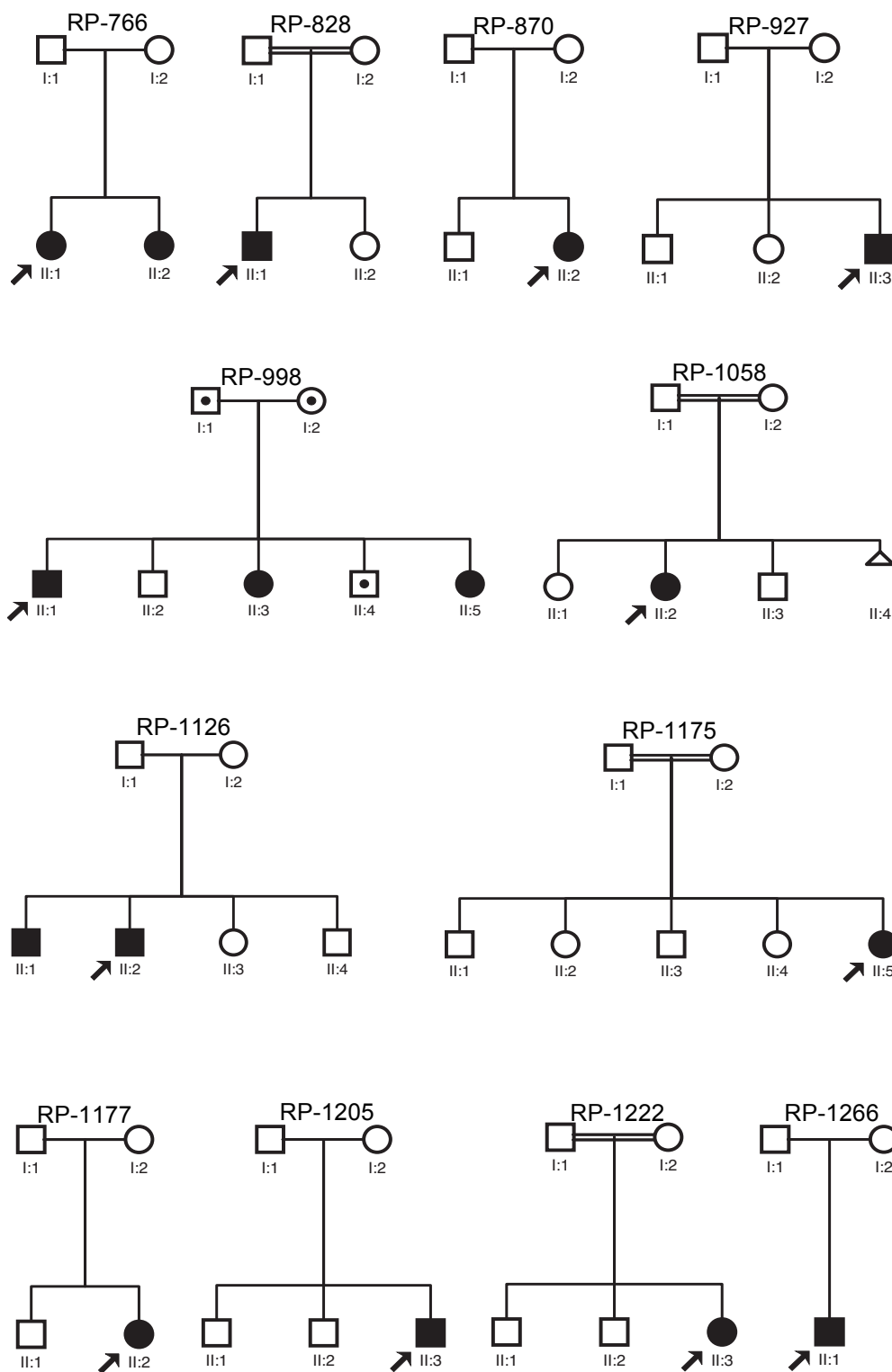


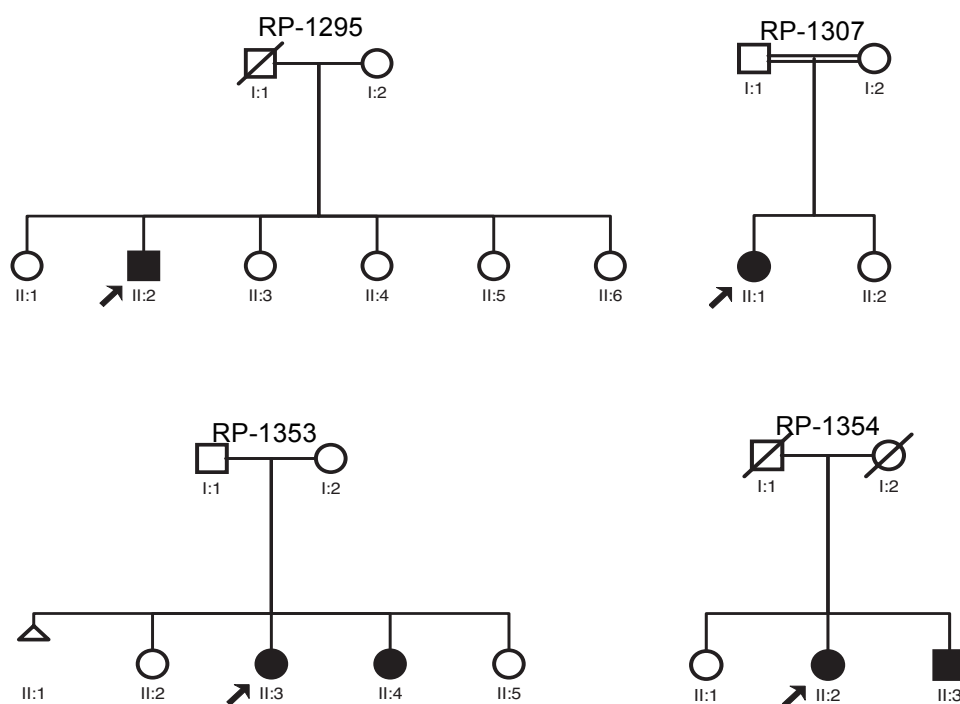


Familias con Distrofia Macular Autosómica Recesiva -Distrofia de conos y bastones-

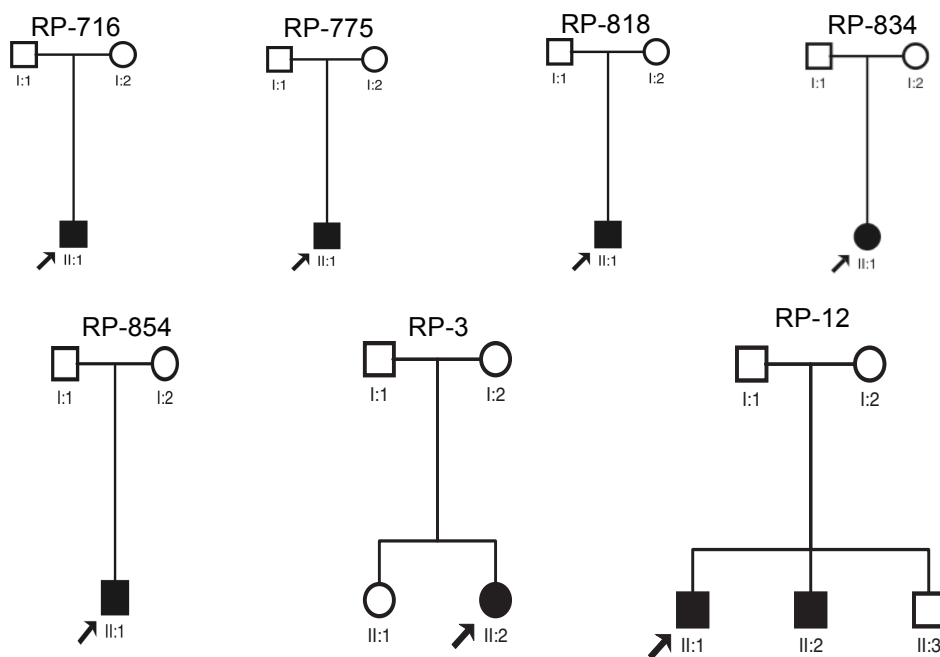


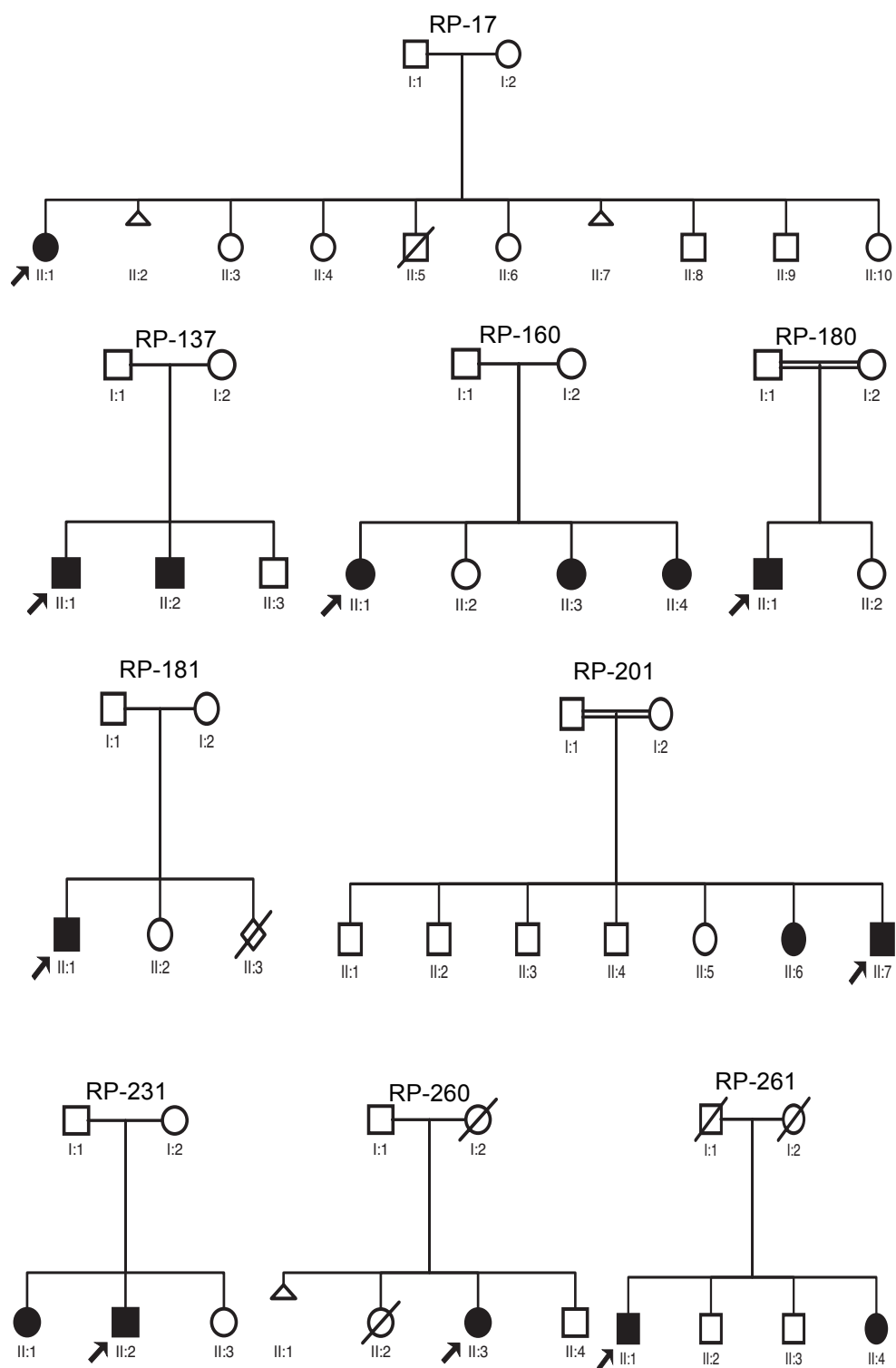


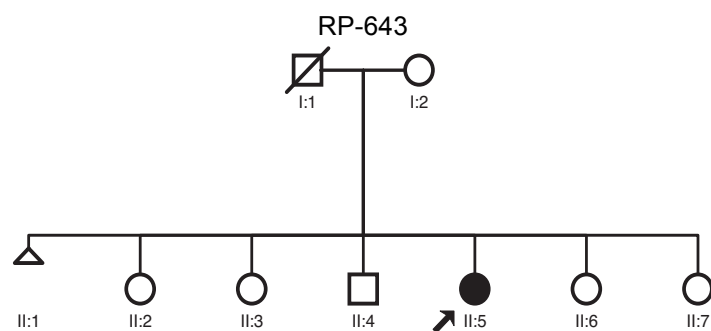
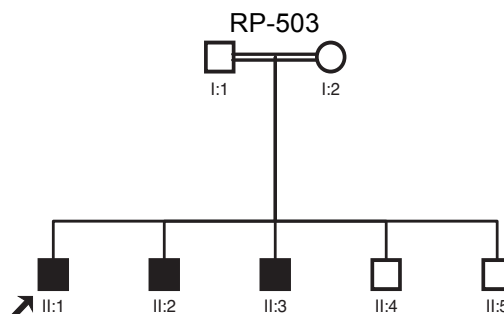
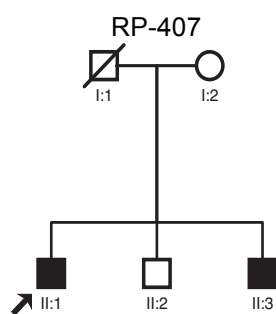
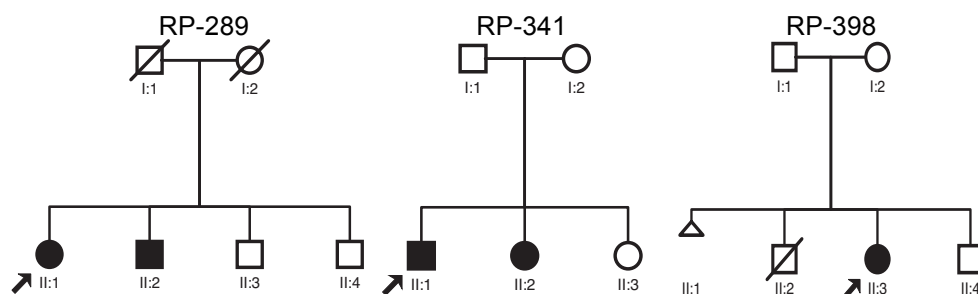
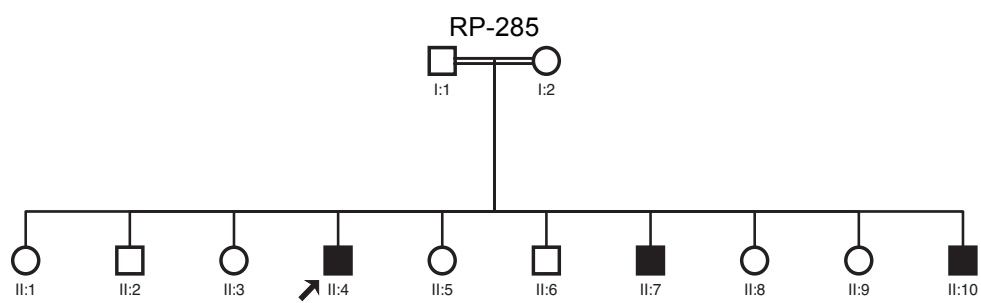


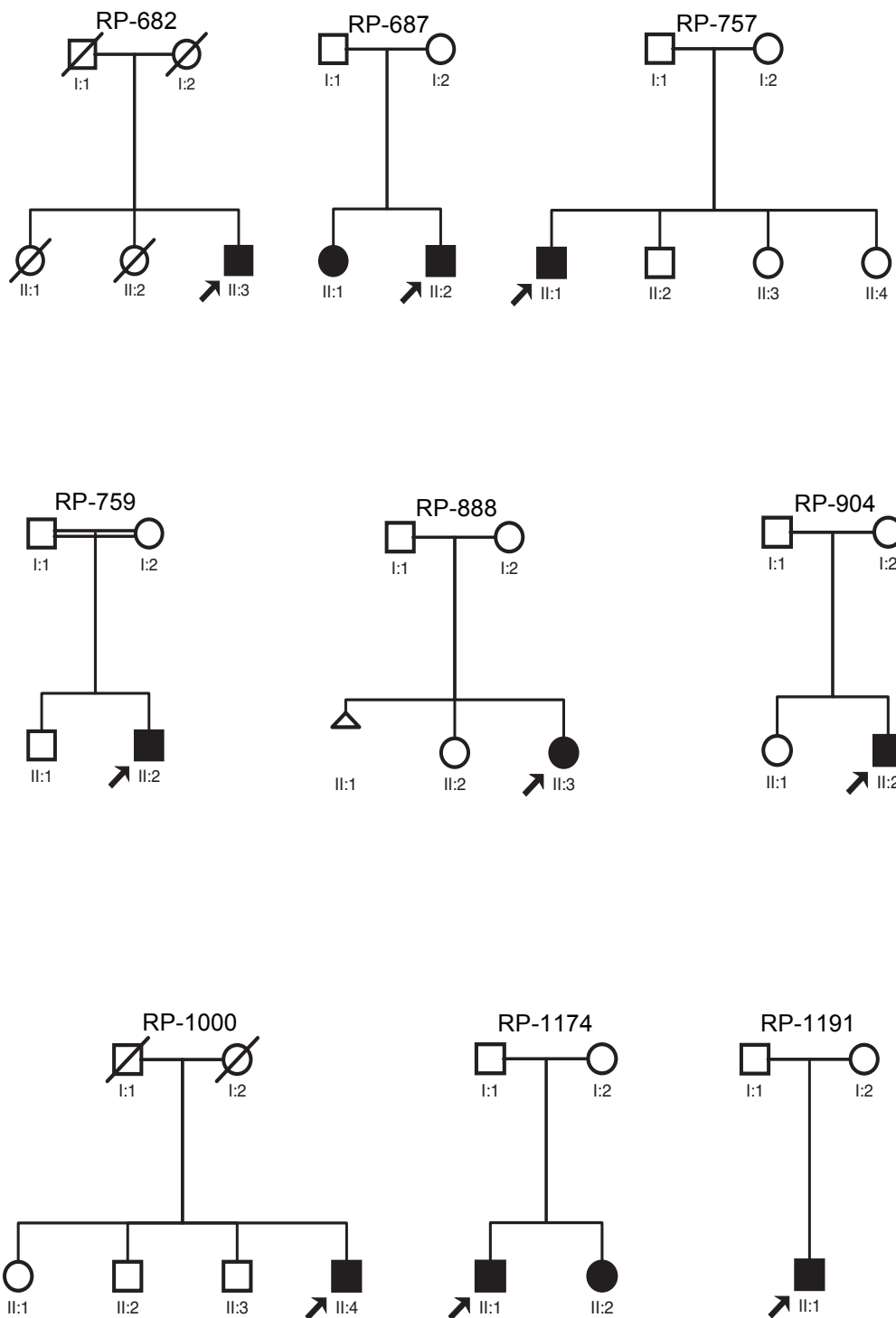


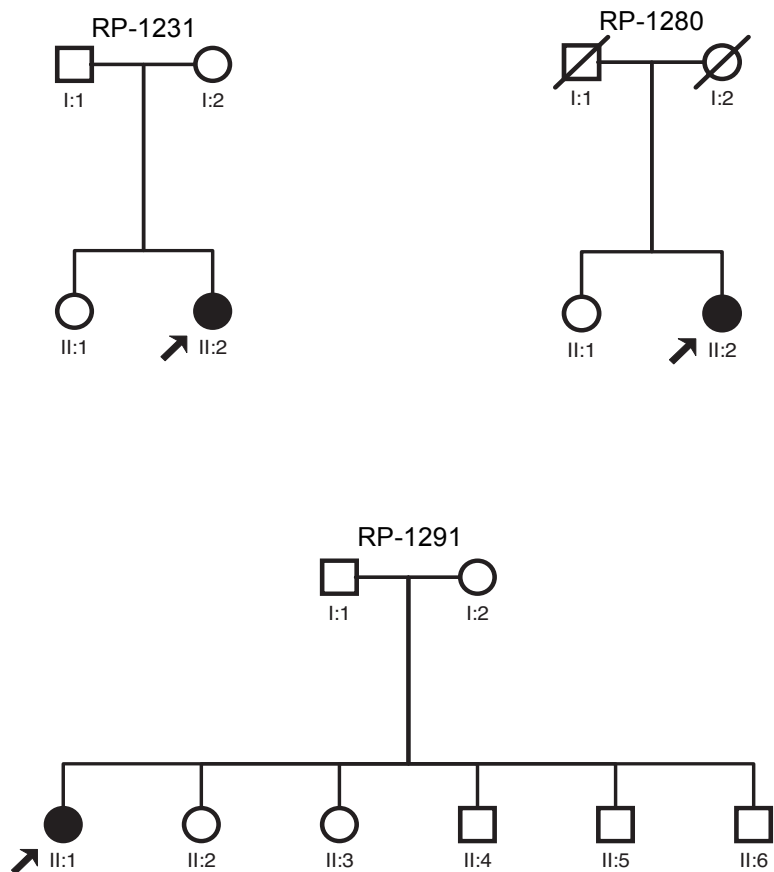
Familias con Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva











2. METODOLOGÍA

2.1- OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO

El material de partida empleado en los estudios moleculares ha sido el *ácido desoxirribonucleico* o *ADN*, obtenido a partir de muestras de 7 centímetros cúbicos (cc) de sangre periférica con *EDTA* (*ácido etilendiaminotetraacético*), que se trata de un anticoagulante.

2.1.1- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN fue extraído empleando dos métodos distintos:

2.1.1.1- EXTRACCIÓN DE ADN POR EL MÉTODO SALINO

Únicamente las muestras más antiguas fueron extraídas por este método. La muestra de sangre es tratada con una serie de disoluciones tampón que rompen las membranas celulares de los eritrocitos y de los leucocitos. Los leucocitos o glóbulos blancos son las células de la sangre que poseen núcleo a partir de las cuales se obtiene el ADN.

2.1.1.2- EXTRACCIÓN AUTOMÁTICA DEL ADN

En la mayoría de los casos, la extracción de ADN se ha llevado a cabo mediante una extracción automática para la cual se emplea un BioRobot EZ1 (*QIAGEN, Hilden, Germany*). Este aparato permite la extracción de un máximo de 6 muestras simultáneamente. A partir de 350 µl de sangre periférica del paciente, el ADN se aísla basándose en la tecnología de partículas magnéticas. El fundamento de este proceso es el siguiente:

- 1- El lisado de las membranas celulares de los eritrocitos.
- 2- Las partículas magnéticas se añaden a las muestras.
- 3- El ADN se une a estas partículas magnéticas.
- 4- Separación de las partículas magnéticas empleando varios tampones de lavado.
- 5- Por último, elución del ADN en 100 μ l de buffer TE, obteniéndose una concentración óptima de 50 nanogramos por microlitro (ng/ μ l)

2.1.2- CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Esta técnica se empleó únicamente para medir la concentración de ADN de las muestras que fueron extraídas por el método salino, ya que la concentración del ADN era desconocida.

Se cuantifican las muestras en un sofisticado espectrofotómetro , para su empleo requiere ser conectado a un software. Es capaz de medir ácidos nucleicos, proteínas y ácidos ribonucleicos (RNAs).

El protocolo empleado fue el siguiente:

1- En la pantalla principal del programa elegir el tipo de análisis: medir

ácidos nucleicos.

2- Lavar con 1µl de H₂Od.

3- Preparación del blanco: añadir 1µl de H₂Od, dar en la tecla que dice “blank”;

la concentración obtenida es de 0 ng/µl.

4- Medición de la muestra problema: añadir 1µl de la muestra de ADN,

dar en la tecla “measure”.

5- Registrar las concentraciones (ng/µl) y las medidas de las absorbancias obtenidas:

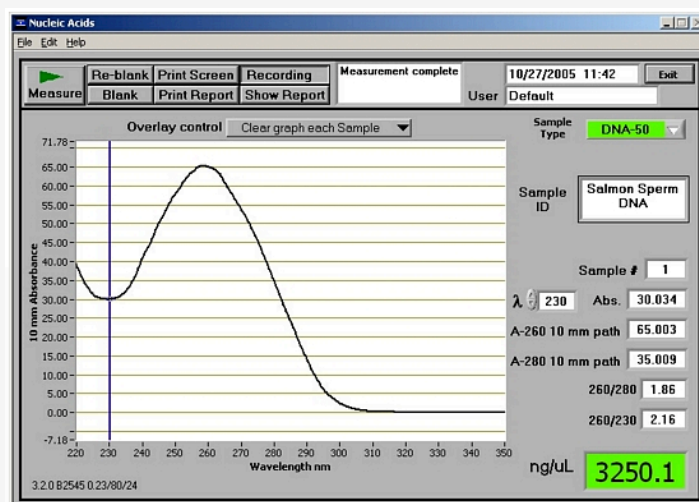
Abs 230nm: indica la concentración de sales;

Abs 260nm: indica la concentración de ADN;

Abs 280nm: indica la concentración de proteínas;

Coefficiente Abs260/Abs280: indica la pureza:

- valores $\approx 1,6$: indican contaminación de proteínas
- valores ≈ 2 : indican contaminación por RNA



2.2- ESTUDIO GENÉTICO DIRECTO

El protocolo para abordar el estudio directo del gen *ABCA4* se realizó de la siguiente manera:

- 1- Cribado de mutaciones y polimorfismos mediante un microarray de genotipado, en el afecto
- 2- Confirmación de resultados obtenidos mediante amplificado y secuenciación automática de los exones en los que se han identificado las mutaciones responsables.
- 3- Ampliación del estudio directo a los familiares mediante secuenciación de los fragmentos en los que se han localizado las mutaciones.
- 4- En pacientes con uno o ningún alelo mutante identificado, cribado de la región exónica completa mediante *dHPLC* (*denaturing High Performance Liquid Chromatography*).
- 5- En pacientes con uno o ningún alelo mutante identificado, cribado de la región exónica completa mediante *High Resolution Melting*.
- 6- En pacientes con uno o ningún alelo mutante identificado, cribado de la región exónica completa mediante MLPA (*Multiplex Ligation Probe Assay*).
- 7- Confirmación de mutaciones nuevas en población control mediante ensayo de restricción, *dHPLC*, *High Resolution Meeting* o secuenciación, según la mutación identificada.

2.2.1- CRIBADO DE MUTACIONES MEDIANTE MICROARRAY DE GENOTIPADO

El microarray de genotipado (ABCR-Asperbio) se ha empleado con el fin de realizar un análisis mutacional previo en *ABCA4*. Permite la identificación de aproximadamente 500 variantes genéticas del gen *ABCA4* en una sola reacción, que representa la detección del 75% de las alteraciones descritas en este gen, incluyendo mutaciones y polimorfismos de un único nucleótido (*SNPs*, *Single Nucleotide Polymorphisms*) (Jaakson J *et al.*, 2003).

2.2.2- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como **PCR** por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.

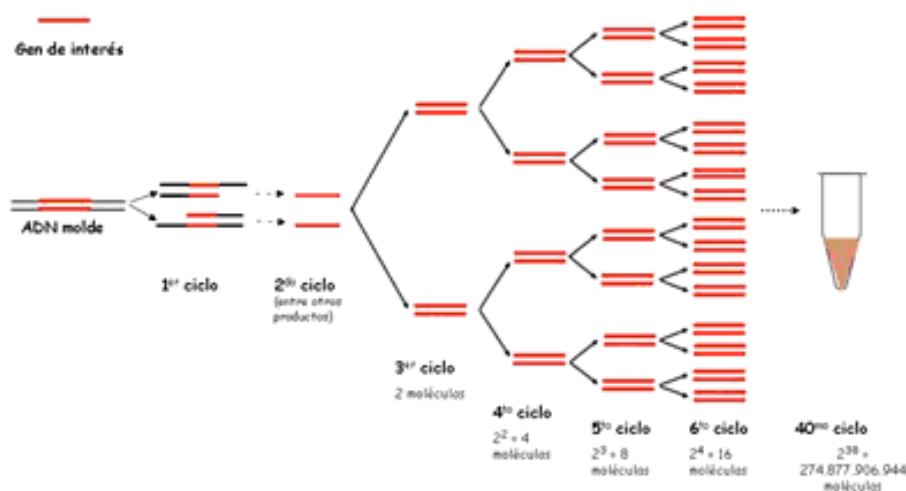


Figura 3.1. Representación gráfica de la reacción en cadena de la polimerasa.

2.2.2.1- CONDICIONES DE LA PCR

Todos los exones del gen ABCA4 han sido amplificados mediante PCR (Rivera *et al.*, 2000). Esta reacción se ha realizado en un termociclador *GeneAmp PCR System 2700* (*Applied Biosystems*). El volumen final de la reacción fueron 50 μ l.

Las condiciones de la PCR se muestran en la siguiente tabla:

| Reactivos, Concentraciones y Volúmenes | | | Ciclos (n=30) | |
|--|--------------------------|-------------------------|----------------|----------|
| Reactivo | Concentración | Volumen | Temperatura | Tiempo |
| ADN | 50 ng/ μ l | 2 μ l | 95°C | 5 min |
| Tampón (<i>Roche</i>) | 1,5 mM MgCl ₂ | 5 μ l | 95°C | 20 s |
| Nucleótidos (<i>Invitrogen</i>) | 1,25 mM (de cada uno) | 8 μ l | T _h | 20 s |
| Cebadores (<i>Pacisa+Giralt</i>) | 10 μ M (de cada uno) | 2 μ l (de cada uno) | 72°C | 40 s |
| Taq polimerasa (<i>Roche</i>) | 2,5 unidades | 0,5 μ l | 72°C | 10 min |
| Agua estéril (<i>Braun</i>) | csp 50 μ l | 30,5 μ l | 4°C | ∞ |

Tabla 3.2. Condiciones empleadas para amplificar los diferentes exones del gen ABCA4.

Leyendas: **ng**, nano gramo; **mM**, mili molar; **μ M**, micro molar; **μ l**, micro litro; **csp**, cantidad suficiente para; **min**, minuto; **s**, segundos.

Las temperaturas de hibridación (T_h) empleadas en la amplificación de los diversos fragmentos se verán a continuación.

2.2.2.2- CEBADORES EN LA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

A continuación, se muestran las secuencias de los cebadores (sentido –S- y antisentido –AS-) empleados para realizar la amplificación de las cincuenta regiones exónicas del gen ABCA4, las temperaturas de hibridación y el tamaño de cada fragmento en pares de bases (pb):

| Exón | Cebadores | | T _h (°C) | Tam. (pb) |
|-------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------|
| STG1 | S⇒ 5' AATCTGGTCTTCGTGTGGTC 3' | AS⇒ 5' GTTTATTTGCTCCACACCTC 3' | 58 | 141 |
| STG2 | S⇒ 5' AATCTCTTAGCACCCTGAAC 3' | AS⇒ 5' AGGCCAGACCAAAGTCTC 3' | 58 | 197 |
| STG3 | S⇒ 5' CCTGCTTGGTCTCCATGAC 3' | AS⇒ 5' ACGTGAAGGGGTGTGCAAC 3' | 57 | 249 |
| STG4 | S⇒ 5' CCTTATTAATGAGGCTTTGTC 3' | AS⇒ 5' ATAGGTGAGGGAAATGATGC 3' | 57 | 213 |
| STG5 | S⇒ 5' CCATTTCCCCTTCAACACCC 3' | AS⇒ 5' GTGCTTCCCTCCCCTCCAG 3' | 58 | 220 |
| STG6 | S⇒ 5' CTACCACAGGGCAGTTTCTA 3' | AS⇒ 5' CAGGAATCACCTTGCAATTG 3' | 58 | 285 |
| STG7 | S⇒ 5' GATCAGACTGTGCCTATGTG 3' | AS⇒ 5' ATAAGTGGGGTAAATGGTGG 3' | 57 | 229 |
| STG8 | S⇒ 5' GAGCATTGGCCTCACAGCAG 3' | AS⇒ 5' CCCAGGTTTGGTTTCACC 3' | 54 | 400 |
| STG9 | S⇒ 5' AGGTTACAAGCAATGGGGAG 3' | AS⇒ 5' TCTGGGAGGTCCAGGGTAC 3' | 58 | 239 |
| STG10 | S⇒ 5' ATCTTTGTCTGGTTTTAGGC 3' | AS⇒ 5' CCCCCCTTACTCTGATCAT 3' | 50 | 145 |
| STG11 | S⇒ 5' GAATTTCTAAGCAGAGCAGTG 3' | AS⇒ 5' AGCTCTGGCCCCACTCATG 3' | 54 | 303 |
| STG12 | S⇒ 5' AGTTGAGTGTTCAGTTGG 3' | AS⇒ 5' CTGACTTTGGAGAAATGCAG 3' | 58 | 307 |
| STG13 | S⇒ 5' TCGGGAGGTGTGAGTGAGC 3' | AS⇒ 5' TTAGCGTGCATGGAGGAGG 3' | 58 | 277 |
| STG14 | S⇒ 5' TTAGCGTGCATGGAGGAGG 3' | AS⇒ 5' AATCCAGGCACATGAACAGG 3' | 57 | 362 |
| STG15 | S⇒ 5' AGGCTGGTGGGAGAGAGC 3' | AS⇒ 5' GGAAGTGTACGGACCATTG 3' | 56 | 373 |
| STG16 | S⇒ 5' CTGTTGCATTGGATAAAAGGC 3' | AS⇒ 5' GATGAATGGAGAGGGCTGG 3' | 56 | 330 |
| STG17 | S⇒ 5' CTGCGGTAAGGTAGGATAGGG 3' | AS⇒ 5' CACACCGTTTACATAGAGGGC 3' | 58 | 231 |
| STG18 | S⇒ 5' CTCTCCCCCTCCTTCCTG 3' | AS⇒ 5' GCCTTTTCCTCGCCTCTG 3' | 56 | 209 |
| STG19 | S⇒ 5' TGGGGCCATGTAATTAGGC 3' | AS⇒ 5' TGGGAAAGAGTAGACAGCCG 3' | 57 | 320 |
| STG20 | S⇒ 5' GCCCTCCTAAGGCATGTTG 3' | AS⇒ 5' TATCTCTGCCTGTGCCAG 3' | 57 | 294 |
| STG21 | S⇒ 5' GTAAGATCAGCTGCTGGAAG 3' | AS⇒ 5' GAAGCTCTCCTGCTCCAAGC 3' | 58 | 305 |
| STG22 | S⇒ 5' AGGTACCCCCACAATGCC 3' | AS⇒ 5' AGCCAGCCCAGGAGACT 3' | 56 | 260 |
| STG23 | S⇒ 5' TTTTGAACCTATATAGCCAGG 3' | AS⇒ 5' AGCCTGTGTGAGTAGCCATG 3' | 58 | 382 |
| STG24 | S⇒ 5' GCATCAGGGAGAGGCTGTC 3' | AS⇒ 5' CCAGACGGAACCAAGTATG 3' | 59 | 187 |
| STG25 | S⇒ 5' GGTAACCTCACAGTCTTCC 3' | AS⇒ 5' GGGAACGATGGCTTTTTGC 3' | 56 | 379 |
| STG26 | S⇒ 5' TCCATTATGAAGCAATACC 3' | AS⇒ 5' CCTTAGACTTTGAGATGG 3' | 48 | 220 |
| STG27 | S⇒ 5' GAGATCCAGACCTTATAGGC 3' | AS⇒ 5' GTTATAACCCATGCCTGAAG 3' | 54 | 415 |
| STG28 | S⇒ 5' ACGTGTGACATCTCCATGCC 3' | AS⇒ 5' CCCTTCTAAGCAGCATGTGA 3' | 58 | 250 |
| STG29 | S⇒ 5' AGGCTCTGAGTTGCATGATG 3' | AS⇒ 5' CTGCCATCTGAACCCACC 3' | 59 | 234 |
| STG30 | S⇒ 5' ACTTTGAGGCTGATTATGGAA 3' | AS⇒ 5' CCCCCTGTTTGGAGGTC 3' | 54 | 253 |
| STG31 | S⇒ 5' TATAAGTCCTCAAGTTCCAAG 3' | AS⇒ 5' AATATCTTCTACAGGGAGCC 3' | 56 | 198 |
| STG32 | S⇒ 5' TAACGGCACTGCTGACTTG 3' | AS⇒ 5' TCATGGCTGTGAGGTGTGC 3' | 58 | 180 |
| STG33 | S⇒ 5' TTCATGTTTCCCTACAAAACCC 3' | AS⇒ 5' AAAATCCTACTCAAATCTCCAG 3' | 58 | 228 |
| STG34 | S⇒ 5' GCTTAACCTACCATGAATGAG 3' | AS⇒ 5' TCAGCAGGAGGAGGGATG 3' | 56 | 269 |
| STG35 | S⇒ 5' TAACTAGCTGTTAATGCAGCG 3' | AS⇒ 5' AAGAGTGAGAGAGGTGACAA 3' | 58 | 270 |
| STG36 | S⇒ 5' GTATCTTCTCCTCTTCTGC 3' | AS⇒ 5' CACACAAGCTCCACCTTGG 3' | 58 | 303 |

| Exón | Cebadores | | T _h . (°C) | Tam. (pb) |
|-------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------|
| STG37 | S⇒ 5'CAGGTCTGAGAGGTTAAGTG 3' | AS⇒ 5'CCACCAGGCTTCTCTTCAG 3' | 58 | 211 |
| STG38 | S⇒ 5'GGAATGGAATGTGGAAGTCC 3' | AS⇒ 5'ACACATACTCTACTATCCTAC 3' | 54 | 253 |
| STG39 | S⇒ 5'GGTTTGCCCCGTTTCCAAC 3' | AS⇒ 5'TCCCAGCTTTGGACCCAG 3' | 56 | 211 |
| STG40 | S⇒ 5'AGGTCTGTGGGTGAGCTG 3' | AS⇒ 5'TCTGGATGCCCTGAGCTGC 3' | 58 | 236 |
| STG41 | S⇒ 5'GAAAGGACAGTGCCAAGGAC 3' | AS⇒ 5'TCTAACCAGCACCTCCAAAC 3' | 58 | 221 |
| STG42 | S⇒ 5'CCGTCTCAGTTCTCAGTCC 3' | AS⇒ 5'AGAGCTGATGTTCCGAAGCC 3' | 57 | 149 |
| STG43 | S⇒ 5'CTTACCCTGGGGCCTGAC 3' | AS⇒ 5'TCAGAGCCACCCTACTATAG 3' | 56 | 276 |
| STG44 | S⇒ 5'GAAGCTTCTCCAGCCCTAGC 3' | AS⇒ 5'TGCACTCTCATGAAACAGGC 3' | 54 | 287 |
| STG45 | S⇒ 5'CTGTCTTCTCCAAATGGCA 3' | AS⇒ 5'TTTAAGCCCTTGGTGC GGC 3' | 51 | 208 |
| STG46 | S⇒ 5'GAAGCAGTAATCAGAAGGGC 3' | AS⇒ 5'CCTCACATTCTTCCATGCTG 3' | 57 | 256 |
| STG47 | S⇒ 5'CACATCCCACAGGCAAGAG 3' | AS⇒ 5'ATCCACAGAAGGCAAGC 3' | 57 | 219 |
| STG48 | S⇒ 5'AGGCCCAACCACTAACAGAG 3' | AS⇒ 5'ACACTGGGTGTTCTGGACC 3' | 57 | 357 |
| STG49 | S⇒ 5'GTGTAGGGTGCTGTTTCC 3' | AS⇒ 5'CAAGCTGTGGACTGCATAAG 3' | 54 | 178 |
| STG50 | S⇒ 5'AAACCAAGATGACGCGAGTC 3' | AS⇒ 5'GGAACGAGCGGTGTGAAAG 3' | 57 | 66 |

Tabla 3.3. Cebadores empleados para amplificar las regiones exónicas del gen *ABCA4*, descritos por Rivera A *et al.*, 2000.

2.2.3- PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Actualmente, se emplean dos métodos para la purificación del producto de PCR y son los siguientes:

2.2.3.1- PURIFICACIÓN A PARTIR DEL PRODUCTO DE PCR

Cuando el fragmento amplificado está constituido de una única banda, es decir, no aparecen bandas inespecíficas, el producto de PCR se purifica directamente. Para ello se empleó un kit comercial (*E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit, OMEGA*) y el protocolo empleado fue el siguiente:

- 1- Añadir 20 μ l del producto de PCR y 100 μ l de tampón *CP* en un tubo *ependorf* de 1,5 ml.
- 2- Aplicar la solución a la columna *HiBind*[®] colocada en un tubo colector de 2 ml.
- 3- Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min a tpa.amb.
- 4- Tirar el líquido sobrante.
- 5- Añadir 650 μ l de tampón de lavado (*Wash Buffer*) y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min a tpa.amb. Tirar el líquido sobrante.
- 6- Centrifugar la columna vacía a 13.000 rpm durante 1 min a tpa.amb., para secarla.
- 7- Colocar la columna en un tubo *ependorf* de 1,5 ml. y añadir 30 μ l de solución *EB*, para eluir el ADN y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min a tpa.amb.

2.2.3.2- PURIFICACIÓN A PARTIR DE GEL DE AGAROSA

En este caso, el fragmento amplificado está constituido por más de una banda, es decir, aparecen bandas inespecíficas. Estos amplificados se resuelven mediante electroforesis en un gel de agarosa a una concentración del 3%, que permite separar fragmentos de ADN en un rango de 125-600 pb. Para determinar que banda es la del fragmento de interés se empleó un marcador de peso molecular de un rango de una kilobase (kb).

El protocolo empleado para la realización de la electroforesis fue el siguiente:

- 1- Preparar una carcasa con peines.
- 2- Pesar 1,5 g de agarosa (*Serva*) y medir 50 ml de tampón TBE 1x (Tris-Borato-EDTA). Los dos productos se añaden a un matraz que se tapa y se calienta en un microondas hasta disolver la agarosa por completo. Una vez disuelta, añadir 3 µl de bromuro de etidio (*Roche*).
- 3- Verter en la carcasa preparada y dejar gelificar.
- 4- Cargar las muestras mezcladas con azul de bromofenol, en la siguiente proporción:
30 µl de producto de PCR + 3 µl de azul de bromofenol 6x (10% del volumen de muestra).
- 5- Cargar el marcador de peso molecular 1 kb (*Roche*) mezclado con azul de bromofenol, en la siguiente proporción:
2 µl de marcador + 10 µl de azul de bromofenol 1x.
- 6- Introducir el gel en una cubeta de electroforesis (Bio-Rad) con tampón TBE 1x. Correr a 90 V, durante 30 min.
- 7- Visualizar el gel con luz UV (*Gelprinter® SuperII*).

A continuación se especifican los reactivos empleados en la preparación del gel de agarosa:

Reactivos:

Tampón TBE 1x: partir del tampón comercial TBE 10x (*Pronadisa*) y llevar a una concentración 1x con H₂O.

Azul de bromofenol 6x: 0,25 g de azul de bromofenol + 40 g de sacarosa, y enrasar con H₂O hasta 100 ml.

Azul de bromofenol 1x: Añadir 5 volúmenes de TBE 1x por volumen de azul de bromofenol 6x.

Después de realizar la electroforesis a los productos de PCR, el gel se coloca en un transiluminador, con el fin de localizar la banda del fragmento de interés. Una vez detectada, el fragmento de ADN del gel se extrae con ayuda de una cuchilla limpia y se introduce en un tubo *eppendorf* de 1,5 ml.

A continuación, se lleva a cabo la purificación. Existen dos métodos para la purificación del producto de PCR:

2.2.3.2.1- PURIFICACIÓN MANUAL

El protocolo, realizado mediante un kit comercial (*QIA-quick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Germany*), fue el siguiente:

- 1- Añadir 3 volúmenes de buffer QG (μ l) por volumen de gel (mg).
- 2- Incubar a 50°C durante 20 min para que el gel se disuelva.
- 3- Tras la completa disolución del gel, añadir 150 μ l de isopropanol y homogeneizar, mezclando con la pipeta.
- 4- Añadir la mezcla en una columna colocada en un tubo de 2 ml y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min a tpa.amb.
- 5- Tirar el líquido sobrante y volver a colocar la columna en el mismo tubo.
- 6- Añadir 650 μ l de tampón de lavado (buffer PE), dejar durante 2-5 min y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min a tpa.amb.
- 7- Eliminar el líquido sobrante y centrifugar de nuevo a 13.000 rpm durante 1 min a tpa.amb.
- 8- Colocar la columna en un tubo *eppendorf* de 1,5 ml limpio.
Añadir 30 μ l de tampón de elución (buffer EB), dejar reposar durante 5 min y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min a tpa.amb.

2.2.3.2.2- PURIFICACIÓN AUTOMÁTICA

Para la realización de este proceso se empleó un innovador aparato: el QIAcube.



Figura 3.2. Imágenes del aparato

Se trata de un sistema automatizado que permite la purificación de hasta 12 muestras a la vez. Los pasos son los mismos que en el protocolo manual. De este modo, empleando una tecnología avanzada pero sin cambios en el proceso de purificación, se incrementa la productividad y se obtienen resultados fiables y estandarizados.

2.2.4- SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

2.2.4.1- REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

Una vez que el producto de PCR está purificado podemos, entonces, llevar a cabo la reacción de secuenciación. En la reacción se empleó un *premix* (ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, *Applied Biosystems*) que incorpora los siguientes reactivos: tampón de la reacción, dNTPs (90%), ddNTPs (10%) y la enzima ADN polimerasa. Las condiciones de la reacción se muestran en la siguiente tabla:

| Reactivos y Volúmenes | | Ciclos (n=25) | |
|--------------------------------|-----------|---------------|--------|
| Reactivo | Volumen | Temperatura | Tiempo |
| ADN | 6 µl | 94°C | 3 min |
| Premix (Applied Biosystems) | 4 µl | 96°C | 10 s |
| Cebador [10mM] (Pacisa+Giralt) | 2 µl | 50°C | 20 s |
| Agua estéril (Braun) | csp 20 µl | 60°C | 2 min |
| | | 4°C | ∞ |

Tabla 3.4. Condiciones de la reacción de secuenciación.

El volumen final de la reacción fueron 20 µl y la temperatura de hibridación (T_h) fueron 50°C. La reacción de PCR se realizó en un termociclador *GeneAmp PCR System 2700* (Applied Biosystems).

2.2.4.2- PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO SECUENCIADO

El producto de la reacción de secuenciación es necesario purificarlo mediante unas columnas que contienen un polímero denominado *Sephadex G-501* (Princeton Separations), que permite eluir las moléculas de mayor tamaño, mientras que las moléculas pequeñas quedan retenidas en el interior de cada una de las bolitas que forman esta matriz. De manera que, al centrifugar la columna se obtiene el producto secuenciado, mientras que los reactivos sobrantes (dNTPs, ddNTPs, enzima, etc.) quedan retenidos en la columna.

El protocolo de purificación es el siguiente:

- 1- Añadir 800 μ l de H₂O estéril (*Braun*) en la columna de Sephadex.
- 2- Dejar rehidratando durante 1-2 horas.
- 3- Centrifugar la columna a 4.000 rpm, 2 min a tpa.amb.
- 4- Eliminar el líquido sobrante y volver a centrifugar a 4.000 rpm, 2 min a tpa.amb.
- 5- Colocar la columna en un tubo *ependorf* de 1,5 ml y añadir 20 μ l de la reacción de secuenciación.
- 6- Centrifugar a 4.000 rpm, durante 2 min a tpa.amb.
- 7- Recoger el ADN eluído y reservar.
- 8- Lavar las columnas con 800 μ l de H₂O estéril.
- 9- Centrifugar 2 veces a 4.000 rpm, 2 min a tpa.amb.
- 10- Tirar el líquido sobrante y conservar a 4°C.

A continuación, el producto de la reacción de secuenciación purificado se resuelve mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático (*ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*) y la información obtenida se analiza mediante el programa informático *Sequencing Analysis Software v 5.1.1*.

10 μ l del producto de la reacción de secuenciación + 10 μ l formamida (*Merck*)

2.2.5- Técnica de dHPLC

Cromatografía es un término muy amplio que se aplica a distintos métodos físicos de separación de sustancias mediante su distribución entre una fase estacionaria y una fase móvil.

En nuestro caso, la técnica de dHPLC (*denaturing High Performing Liquid Chromatography*) es una cromatografía líquida desnaturante de alta resolución que se basa en la separación de las formas *heteroduplex* y de las *homoduplex*, empleando 2 *buffers*, el primero, el *trietilamonio acetato* (TEAA), cargado positivamente, de modo que los grupos fosfatos del ADN, cargados negativamente, se unirán. Además el TEAA está compuesto de partículas hidrofóbicas que al pasar por la columna se unirá a las burbujas hidrofóbicas de ésta. Por lo tanto se trata de la fase estacionaria.

A continuación, el siguiente *buffer*, que pasa a través de la columna, es el *acetonitrilo*, la fase móvil, al aumentar la concentración de éste, la interacción entre el ADN y el TEAA se reduce y de esta manera conseguimos que el ADN salga de la columna. Las formas *heterodúplex*, menos estables, son las primeras en salir, y a continuación salen las formas *homodúplex*, más estables.

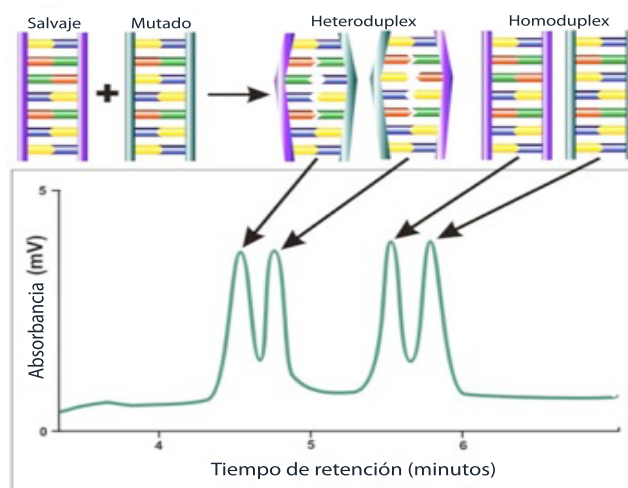


Figura 3.3. Técnica de dHPLC. Patrón teórico de las formas heteroduplex y homoduplex generadas por cada producto renaturalizado.

La detección de patrones alterados o *en* heterodúplex se realizó en el cromatógrafo *WaveTM DNA Fragment Analysis System 4500 (Transgenomic)*, siguiendo el siguiente protocolo:

- 1- Mezclar los productos de PCR (muestra control + muestra problema) en proporción 1:1, ya que el dHPLC no es capaz de diferenciar entre una muestra homocigota normal y una homocigota mutada.
- 2- Desnaturalizar los productos de PCR mezclados a 95°C, 5 min en un termociclador *GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems)*. Pasados los 5 min, apagar el termociclador y dejar 30 min a tpa.amb. para favorecer la formación de los heterodúplex.
- 3- Realizar un purgado a los *buffers* para eliminar posibles burbujas.
- 4- Determinar los gradientes óptimos para eluir los amplificados mediante el programa *NavigatorTM Operador*:
 - Flujo del gradiente: 0,9 ml/min
 - Presión
 - Temperatura del horno
 - Detección del AND: luz UV (260nm)
- 5- Cargar 5 µl del producto de PCR mezclado en la columna (*DnaSepTM column; Transgenomic*).
- 6- Tras 8 min de duración de la carrera, incluyendo lavado y equilibrado de la columna, se analiza las formas heterodúplex y homodúplex (*Wave OptimizedTM; Transgenomic*).

A continuación sólo se secuenciaron las muestras cuyo patrón de picos sea diferente a la muestra control.

La temperatura óptima de análisis de cada fragmento depende de la composición de bases a lo largo del mismo y, por tanto, es variable. En la siguiente tabla se representan las distintas temperaturas óptimas, obtenidas por simulación en el aparato, de las cincuenta regiones exónicas del gen *ABCA4*, como se observa, algunos fragmentos se analizaron empleando más de una temperatura:

| Exón | Tam. (pb) | T (°C) | T (°C) |
|-------|-----------|--------|--------|
| STG1 | 141 | 59,4 | - |
| STG2 | 197 | 57,4 | - |
| STG3 | 249 | 59 | - |
| STG4 | 213 | 59,5 | - |
| STG5 | 220 | 57,5 | 55,8 |
| STG6 | 285 | 62,3 | 61,7 |
| STG7 | 229 | 56 | 54,2 |
| STG8 | 400 | 57 | 57,7 |
| STG9 | 239 | 60,6 | 59,7 |
| STG10 | 145 | 60,7 | 59,7 |
| STG11 | 303 | 59,5 | - |
| STG12 | 307 | 59,2 | - |
| STG13 | 277 | 61,5 | - |
| STG14 | 362 | 58,8 | 57,8 |
| STG15 | 373 | 62 | 61 |
| STG16 | 330 | 60,8 | 59,4 |
| STG17 | 231 | 57 | - |
| STG18 | 209 | 60 | - |
| STG19 | 320 | 60,5 | - |
| STG20 | 294 | 63,1 | 62,5 |
| STG21 | 305 | 61,8 | - |
| STG22 | 260 | 61,5 | - |
| STG23 | 382 | 62 | - |

| Exón | Tam. (pb) | T _h . (°C) | T _h . (°C) |
|-------|-----------|-----------------------|-----------------------|
| STG24 | 187 | 61,9 | - |
| STG25 | 379 | 59,3 | 58,7 |
| STG26 | 220 | 58,3 | 57,3 |
| STG27 | 415 | 61,7 | 60,7 |
| STG28 | 250 | 60,3 | 60,9 |
| STG29 | 234 | 62,8 | 63,4 |
| STG30 | 253 | 60,3 | 59,3 |
| STG31 | 198 | 57,7 | - |
| STG32 | 180 | 57,1 | 56,5 |
| STG33 | 228 | 61 | 60,1 |
| STG34 | 269 | 55,6 | 53,6 |
| STG35 | 270 | 61,5 | - |
| STG36 | 303 | 61,7 | 61 |
| STG37 | 211 | 60,1 | - |
| STG38 | 253 | 59,7 | 58,7 |
| STG39 | 211 | 62,7 | - |
| STG40 | 236 | 63,4 | 61,8 |
| STG41 | 221 | 59,7 | 57,7 |
| STG42 | 149 | 62 | 60,6 |
| STG43 | 276 | 59,9 | 58,9 |
| STG44 | 287 | 58,3 | 57,3 |
| STG45 | 208 | 63,6 | 60,6 |
| STG46 | 256 | 63,1 | 62,6 |
| STG47 | 219 | 62,4 | 60,4 |
| STG48 | 357 | 62,3 | 60,9 |
| STG49 | 178 | 61 | 58,6 |
| STG50 | 66 | 64,9 | - |

Tabla 3.5. Temperaturas óptimas de análisis empleadas en el dHPLC.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución -en condiciones desnaturalizantes- permitió realizar un cribado de muestras con sólo 1 o ningún alelo mutado, previamente estudiadas con el microarray de genotipado. De modo que, la finalidad de esta técnica es la búsqueda de nuevas mutaciones para poder diagnosticar a un número mayor de pacientes.

2.2.6- Técnica de HRM

La técnica de *High Resolution Melting* (HRM) fue empleado para amplificar las 50 regiones exónicas del gen *ABCA4* y detectar variaciones en las secuencias de ADN. Las muestras con diferencias en la secuencia de ADN eran distinguidas por discrepancias observadas en las *curvas de melting*, ya que cada molécula de ADN de doble cadena se caracteriza por su temperatura de *melting*. Esta temperatura es una medida de la estabilidad de un fragmento de ADN y se define como la temperatura a la cual el 50% de la molécula de ADN es doble cadena y el otro 50% se encuentra metilado o en forma de cadena sencilla.

La generación de productos de PCR puede detectarse por el uso de una molécula fluorescente saturante, el R27. Esta molécula se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman.

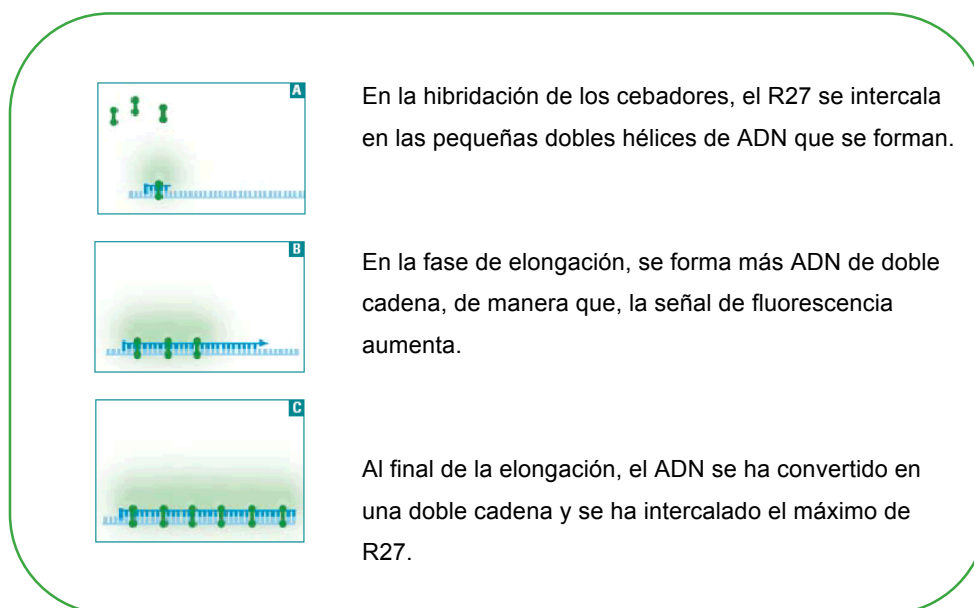


Figura 3.3. La técnica de *High Resolution Melting* se basa en el empleo de una nueva química intercalante, el R27.

Durante la reacción de PCR, el incremento de fluorescencia es directamente proporcional al aumento de ciclos, lo que conlleva un mayor número de cadenas dobles de ADN del fragmento de interés, como se observa en el siguiente gráfico:

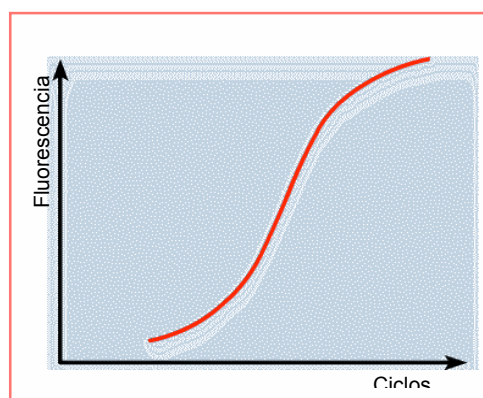


Figura 3.4. Representación gráfica del incremento de fluorescencia.

A continuación se detallan las soluciones y reactivos empleados:

| Solución | Reactivos | Volúmenes |
|---|--|-------------|
| 1: <i>Master Mix Roche</i> | FastStart Taq DNA Polymerase, dNTP mix (con dUTP en vez de dTTP) y High Resolution Melting Dye (<i>SYBR Green I</i>) | 10 μ l |
| 2: <i>MgCl₂, 25 mM Roche</i> | MgCl ₂ , concentración óptima 2,0 mM | 1,6 μ l |
| 3: <i>H₂O, PCR-grade Roche</i> | H ₂ O, para ajustar el volumen final de la reacción | 5,4 μ l |
| | ADN | 1 μ l |
| | Cebadores (<i>Pacisa+Giralt</i>) 0,2 μ M | 2 μ l |

Tabla 3.6. Soluciones y reactivos empleados para amplificar las 50 regiones exónicas mediante el HRM.

El volumen final de la reacción fueron 20 μ l. La reacción de PCR se realizó en el *LightCycler[®] 480 System (Roche)* siguiendo el siguiente proceso:

- 1- Pre-Incubación: proceso en el cual tiene lugar la activación de la enzima y desnaturalización del fragmento de ADN, ya que la temperatura se eleva a 95°C.
- 2- Amplificación específica del ADN diana.
- 3- High resolution melting: se determina la temperatura de melting de cada amplicón utilizando el programa *high resolution data acquisition*.
- 4- Enfriamiento: proceso en el que se disminuye la temperatura del rotor y de la cámara.

Las condiciones de temperaturas, tiempos y número de ciclos de cada proceso se detallan a continuación:

| Programa | Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|-------------------------|------------------|--------|--------|
| Pre-incubación | 95 | 10 s | 1 |
| Amplificación | 95 | 20 s | 30 |
| | T_h | 20 s | |
| | 72 | 40 s | |
| High resolution melting | 95 | 1 min | 1 |
| | 40 | 1 min | |
| | 65 | 1 s | |
| | 95 | 1 s | |
| Enfriamiento | 40 | 10 s | 1 |

Overview

Temperature (°C)

Estimated Time (h:mm:ss)

Tabla 3.7. Condiciones empleadas para amplificar las 50 regiones exónicas mediante el HRM.

Las temperaturas de hibridación (T_h) empleadas en la amplificación de los diversos fragmentos fueron las mismas que las utilizadas en la PCR convencional (Ver Tabla 3.3).

Al igual que la técnica de dHPLC, la finalidad del HRM es la búsqueda de nuevas mutaciones en aquellos pacientes con ningún alelo mutado o solo uno detectado con el microarray de genotipado.

2.2.7- Técnica de MLPA

La técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) ha sido utilizada para poder detectar pérdidas (deleciones) o ganancias (duplicaciones) de material genético. Analiza 48 de los 50 exones del gen *ABCA4*. Esta técnica se basa en la amplificación de sondas específicas previamente hibridadas a las secuencias diana del ADN. Cada sonda consiste en dos oligonucleótidos que hibridan en zonas adyacentes dentro de la secuencia diana del ADN (Figura 3.5.1). A continuación estas sondas hibridadas son ligadas (Figura 3.5.2) y posteriormente se procede a su amplificación mediante PCR con una única pareja de cebadores, ya que todas las sondas contienen secuencias idénticas en sus extremos (Figura 3.5.3).

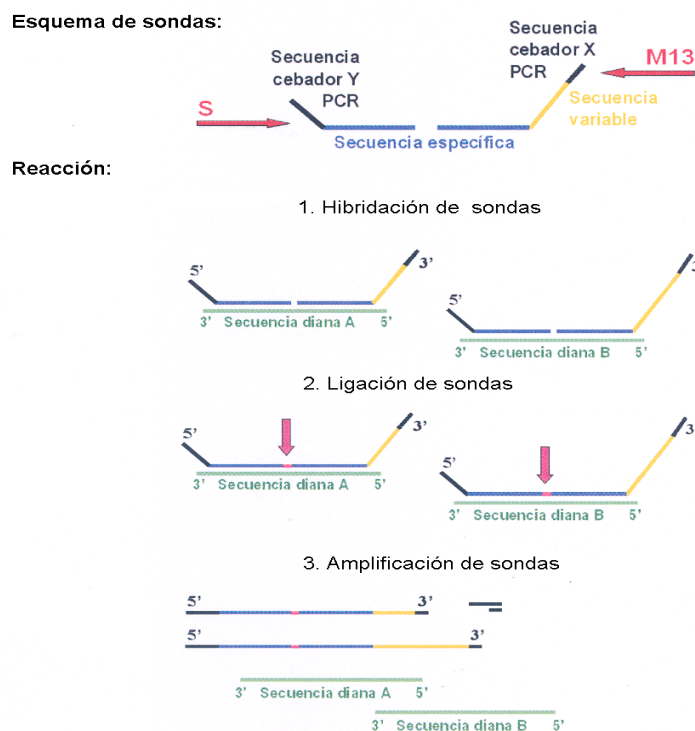


Figura 3.5. Esquema de las sondas y de la reacción de MLPA (modificado de Schouten et al. 2002)

El análisis de las muestras se realizó mediante dos kits comerciales (*MRC-Holland B.V.: SALSA MLPA KIT P151 y P152 ABCA4*), empleando el siguiente protocolo:

1- Desnaturalización del ADN:

Mezclar 3 µl ADN + 2 µl H₂O estéril (*Braun*): desnaturalizar a 95°C, 5 min.

2- Hibridación de las sondas: Dejar enfriar a 25°C y añadir 1,5 µl *SALSA Probe-Mix* + 1,5 µl *MLPA buffer*.

Incubar a 95°C, 1 min y a continuación a 60°C durante 16 horas.

3- Reacción de ligación:

Reducir la temperatura a 54°C, añadir 32 µl de *Mix Ligase* y mezclar.

La solución *Mix Ligase* está formada por:

3 µl de Ligase-65 buffer A + 3 µl de Ligase-65 buffer B + 25 µl de agua destilada + 1 µl de Ligase-65

Incubar a 54°C durante 15 min. A continuación calentar a 98°C, 5 min para inactivar la ligasa y mantener el termociclador a 4°C, 20 min.

4- PCR:

Se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) y las condiciones fueron las siguientes:

| Reactivos | | CICLOS (n=35) | |
|---|-----------|---------------|-----------|
| Reactivo | Volumen | Temperatura | Tiempo |
| Reacción de ligación (ADN molde) | 10 µl | 60°C | (pre-PCR) |
| <i>SALSA PCR buffer 10x</i> (tampón reacción) | 4 µl | 95°C | 30 s |
| <i>SALSA PCR primers</i> (cebadores) | 2 µl | 60°C 35x | 30 s 35x |
| <i>SALSA Enzyme dilution buffer</i> (tampón enzima) | 2 µl | 72°C | 60 s |
| <i>SALSA Polymerase</i> (enzima) | 0'5 µl | 72°C | 20 min |
| Agua estéril (<i>Braun</i>) | csp 50 µl | 4°C | ∞ |

Tabla 3.8. Reactivos y condiciones de la PCR empleada en el MLPA.

5- Electroforesis capilar:

El producto de PCR obtenido se resuelve por electroforesis capilar (*ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*) mediante el programa informático *GeneMapper Software v3.5*.

Las muestras se cargan de la siguiente manera: 3,5 µl producto de PCR + 0,5 µl marcador de peso molecular (*GS-500 Liz; Applied Biosystems*) + 8'5 µl formamida (*Merck*).

2.2.8- ANÁLISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Estos ensayos se han empleado para confirmar ausencia o presencia de una nueva mutación en las muestras control, necesarias para determinar si el nuevo cambio encontrado mediante las distintas técnicas empleadas se trataba o no de una nueva mutación. Una vez determinado el cambio, con ayuda de un programa informático *Vector Nti Suite v9*, buscamos una Endonucleasa de Restricción (ER) que reconozca la secuencia, bien porque la mutación genera una diana de restricción o bien porque destruya dicha diana. La ER utilizada (*New England BioLabs*), las condiciones de digestión, así como los reactivos empleados se recogen en las siguientes tablas:

| Enzima y diana | | Digestión | |
|----------------|-----------------|-------------|---------|
| Enzima | Diana | Temperatura | Tiempo |
| <i>Taq I</i> | 5'...T↓CGA...3' | 37°C | 3 horas |

Tabla 3.9. Enzima de restricción utilizada y condiciones necesarias para la digestión.

| Reactivos y volúmenes | |
|--|----------------|
| Reactivos | Volúmenes |
| ADN (producto de PCR) | 10 μ l |
| Tampón | 2 μ l |
| Enzima de restricción (10 unidades/ μ l) | 3 μ l |
| Agua | csp 20 μ l |

Tabla 3.10. Reactivos empleados en la digestión.

El protocolo para realizar el ensayo de restricción fue el siguiente:

- 1- Amplificar por PCR el fragmento de interés.
- 2- Incubar el producto de PCR con la enzima de restricción a 37°C, 3 horas.
- 3- Resolver mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%.

2.3- ESTUDIO GENÉTICO INDIRECTO

La finalidad de este estudio es la obtención de haplotipos en las familias estudiadas para averiguar si estos cosegregan o no con la enfermedad.

2.3.1- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: PCR

2.3.1.1- CONDICIONES DE LA PCR

Es necesario amplificar las diferentes regiones microsatélites, para ello, se lleva a cabo una PCR cuyas condiciones se exponen en la siguiente tabla:

| Reactivos y Concentraciones | | CICLOS (n=30) | |
|--|--------------------------|---------------|--------|
| Reactivo | Concentración | Temperatura | Tiempo |
| ADN | 50 ng/μl | 95°C | 12 min |
| Tampón (<i>Roche</i>) | 1,5 mM MgCl ₂ | 95°C | 15 s |
| Nucleótidos (<i>Invitrogen</i>) | 2,5 mM (de cada uno) | 55°C | 15 s |
| Cebador <i>sentido</i> marcado con fluorocromo (<i>Applied Biosystems</i>) | 5 μM | 72°C | 30 s |
| Cebador <i>antisentido</i> sin marcar (<i>Pacisa+Giralt</i>) | 5 μM | 89°C | 15 s |
| | | 55°C | 15 s |
| | | 72°C | 30 s |
| Taq polimerasa (enzima) | 2,5 unidades | 72°C | 30 min |
| Agua estéril (<i>Braun</i>) | csp 15 μl | 4°C | ∞ |

Tabla 3.11. Condiciones utilizadas para amplificar los diferentes marcadores microsatélites flanqueantes al gen *ABCA4*.

Estas regiones se amplificaron mediante PCR múltiple (*multiplex PCR*), que permite la amplificación simultánea de tres o cuatro marcadores microsatélites. El volumen final de la reacción fueron 15 μl y la temperatura

de hibridación (T_h) fueron 55°C. La reacción de PCR se realizó en un termociclador *GeneAmp PCR System 2700* (*Applied Biosystems*). Como se indica en la tabla, el cebador sentido está marcado con un fluorocromo que permitirá su posterior detección mediante electroforesis capilar.

2.3.1.2- CEBADORES EN LA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

Las secuencias de los cebadores empleados para amplificar los marcadores microsatélites al gen *ABCA4* así como la localización de los mismos se indican en la siguiente tabla:

| Marcadores | Fluorocromo | Cebadores | Distancia (Mb) | Locus |
|--------------|-------------|--|----------------|-------|
| D1S464 | NED | S⇒ 5'GCCTAAATTTCTTACACATCCTAAC3' AS⇒ 5'GTTTTAAACACCACAAATAAATGT3' | 73,98 | 1p |
| D1S167 | 6-FAM | S⇒ 5'TAAATTCTCCTTGTGGGTC3' AS⇒ 5'TGAGTCATCTGCGTTAAGA3' | 88,51 | 1p |
| D1S435 | HEX | S⇒ 5'GGCCACATGGGAATTTTCT3' AS⇒ 5'AGCAGTTCAAGGCCACAGT3' | 89,81 | 1p |
| D1S2804 | NED | S⇒ 5'AAAGGATATTTTGGCCCTG3' AS⇒ 5'CAACGAGTATATTAGCATGACCC3' | 91,13 | 1p |
| ABCA4 | | | | |
| D1S2868 | PET | S⇒ 5'AGGTATAATCTGCAATAAAAACTT3' AS⇒ 5'AAAGTAAAACAATATGAAGCCAC3' | 91,59 | 1p |
| D1S236 | 6-FAM | S⇒ 5'AAACCACCTACCAATGTCTGTC3' AS⇒ 5'GAAGCTGTCGTTATGGGGT3' | 93,06 | 1p |
| D1S2664 | 6-FAM | S⇒ 5'CAGCCACAGAATAACACTG3' AS⇒ 5'TTCATGCTATGATTTTCCGC3' | 94,20 | 1p |
| D1S2793 | VIC | S⇒ 5'GCCCTTCAGTTCCAGAG3' AS⇒ 5'TGTATTAGTCAAGTTTACCAGAGA3' | 95,35 | 1p |

Tabla 3.12. Marcadores microsatélites flanqueantes al gen *ABCA4*. Leyenda: Mb: megabase.

2.3.2- ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

Los productos de PCR obtenidos se resuelven por electroforesis capilar (*ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*) y se analizan mediante el programa informático *GeneMapper Software v3.5*.

1 µl de la dilución 1:10 del producto de PCR + 0,5 µl marcador de peso molecular (*GS-500 Liz; Applied Biosystems*) + 12 µl formamida (*Merck*).

2.3.3- DISEÑO DE ÁRBOLES GENEALÓGICOS

La construcción de los haplotipos en los correspondientes árboles genealógicos se realizó mediante el programa informático *Cyrillic v2.1*.

2.4- ANÁLISIS DE MARCADORES INTRAGÉNICOS

El análisis realizado con marcadores intragénicos (*SNPs* o polimorfismos de único nucleótido) detectados mediante el microarray de genotipado permite la identificación de asociaciones entre *SNPs* y mutaciones.

Las frecuencias de cada variante, sea *SNP* o mutación, se determinan mediante un programa informático *SPSS 16.0 software* (*SPSS, Inc, Chicago, IL*) empleando para ello distintos métodos estadísticos, determinando así las posibles correlaciones entre las mutaciones y los polimorfismos más frecuentes encontrados en los pacientes estudiados.

2.5- HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Estas herramientas se emplearon para establecer la naturaleza de aquellas variantes que se localizaban en las regiones intrónicas del gen *ABCA4*. Secuencias normales y alteradas eran analizadas con un servidor que reconoce los sitios de corte y empalme de los intrones en humanos del Centro de Análisis de Secuencias Biológicas de la Universidad de Dinamarca (www.cbs.dtu.dk/services).

IV. Resultados

IV. RESULTADOS

1- GEN ABCA4

1.1- ESTUDIO GENÉTICO DIRECTO

1.1.1- FAMILIAS ESTUDIADAS

El estudio molecular directo del gen *ABCA4* fue realizado en un total de 210 familias estudiadas, de las cuales:

- 127 están diagnosticadas de STGD,
- 46 de DCB y
- 36 de RP

1.1.2- TÉCNICA DE MICROARRAY DE GENOTIPADO (*ABCR-Asperbio*)

La caracterización de mutaciones en el gen *ABCA4* se llevo a cabo con el **microarray de genotipado** que permitió identificar pacientes con dos alelos mutados, con un alelo mutado y sin alelos mutados. Los resultados se presentan por fenotipos debido al gran número de familias estudiadas.

a) Enfermedad de Stargardt (STGD)

Mediante esta técnica se estudiaron un total de 110 familias con STGD, entre las cuales se identificaron:

- 48 familias con dos alelos mutantes, 43,6 %
- 24 familias con un alelo mutante, 21,8%
- 38 familias sin ningún alelo mutante, 34,5 %

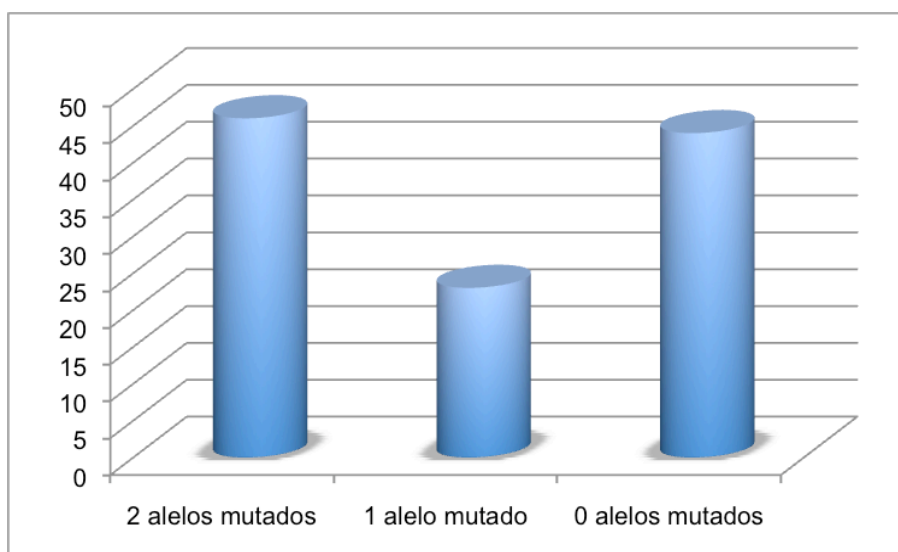


Figura 4.1. Las 110 familias STGD clasificadas en función de los alelos mutados identificados.

Los alelos mutados de *ABCA4* identificados en las distintas familias se recogen en las siguientes tablas:

| Familias con dos alelos mutados (N=48/110) | | | | | | |
|--|-----------|----------------------|----------------------|-----------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 | | | Alelo 2 | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-170 | 9 | c.1122C>T | p.Arg408X | 30 | c.4457C>T | p.Pro1486Leu |
| ARDM-178 | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs | 46 | c.6320G>C | p.Arg2107Pro |
| ARDM-187 | 28 | c.4139C>T | p.Pro1380Leu | 42 | c.5881G>A | p.Gly1961Glu |
| ARDM-191 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 13 | c.1804C>T | p.Arg602Trp |
| ARDM-194 | 19 | c.2791G>A | p.Val931Met | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs |
| ARDM-196 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 40 | c.5644A>G | p.Met1882Val |
| ARDM-198 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 19 | c.2888delG | |
| ARDM-200 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 14 | c.2041C>T | p.Arg681X |
| ARDM-203 | 35 | c.4918C>T | p.Arg1640Trp | 42 | c.5881G>A | p.Gly1961Glu |
| ARDM-207 | 30 | c.4537insC | p.Gln1513fs | 42 | c.5881G>A | p.Gly1961Glu |
| ARDM-215 | 35 | c.4926C>G | p.Ser1642Arg | 47 | c.6449G>A | p.Cys2150Tyr |
| | 36 | 5041 del 15 | p.VVAIC 1681 del | | | |

| Familias con dos alelos mutados (N=48/110) | | | | | | |
|--|-----------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 | | | Alelo 2 | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-216 | 31 | c.4577C>T | p.Thr1526Met | - | IVS40+5 G>A | |
| ARDM-218 | 19 | c.2894 A>G | p.Asn965Ser | 19 | c.2894 A>G | p.Asn965Ser |
| ARDM-227 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 41 | c.5819T>C | p.Leu1940Pro |
| ARDM-238 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 41 | c.5819T>C | p.Leu1940Pro |
| ARDM-242 | 37 | c.5242G>A | p.Gly1748Arg | 12 | c.1715G>C | p.Arg572Pro |
| ARDM-244 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 14 | c.1957C>T | p.Arg653Cys |
| ARDM-249 | 35 | c.4926C>G | p.Ser1642Arg | - | IVS40+5 G>A | |
| | 36 | 5041 del 15 | p.VVAIC 1681 del | | | |
| ARDM-252 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu |
| ARDM-254 | 5 | c.454C>T | p.Arg152X | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu |
| ARDM-260 | 13 | c.1804C>T | p.Arg602Trp | - | IVS40 +5 G>A | |
| ARDM-262 | 13 | c. 1819G>A | p.Gln607Arg | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu |
| ARDM-264 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 47 | c.6449G>A | p. Cys2150Tyr |
| ARDM-266 | 45 | c. 6179T>G | p.Leu2060Arg | 42 | c.5881G>A | p.Gly1961Glu |
| ARDM-267 | 19 | c.2791G>A | p.Val931Met | - | IVS40+5 G>A | |
| ARDM-270 | 6 | c.634C>T | p.Arg212Cys | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu |
| ARDM-277 | 19 | c.2888delG | p.Gly963fs | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu |
| ARDM-279 | 15 | c.2300T>A | p.Val767Asp | 43 | c.5929G>A | p.Gly1977Ser |
| ARDM-280 | 12 | c.1648G>A | p. Gly550Arg | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu |
| ARDM-281 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 35 | c.4926C>G | p.Ser1642Arg |
| | | | | 36 | 5041 del 15 | p.VVAIC 1681 del |
| ARDM-283 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 19 | c.2888delG | p.Gly963fs |
| ARDM-284 | 42 | c.5881G>A | p.Gly1961Glu | 45 | c. 6179T>G | p.Leu2060Arg |
| ARDM-287 | 21 | c.3056C>T | p.Thr1019Met | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu |
| ARDM-288 | 22 | c.3322C>T | p.Arg1108Cys | 8 | c.982G>T | p.Glu328X |
| ARDM-291 | 45 | c. 6179T>G | p.Leu2060Arg | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu |
| ARDM-298 | 8 | c.982G>T | p.Glu328X | 43 | c.5929G>A | p.Gly1977Ser |
| ARDM-305 | 21 | c.3056C>T | p.Thr1019Met | 22 | c.3322C>T | p.Arg1108His |
| ARDM-307 | - | IVS35+2T>C | | 28 | c.4200C>A | p.Tyr1400X |
| ARDM-317 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu |

| Familias con dos alelos mutados (N=48/110) | | | | | | |
|--|---------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 | | | Alelo 2 | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-323 | 27 | c.3899G>A | p.Arg1300Gln | 41 | c.5819T>C | p.Leu1940Pro |
| ARDM-326 | 30 | c.4457C>T | p.Pro1486Leu | 43 | c.5929G>A | p.Gly1977Ser |
| ARDM-329 | 41 | c.5819T>C | p.Leu1940Pro | 41 | c.5819T>C | p.Leu1940Pro |
| ARDM-331 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 21 | c.3056C>T | p.Thr1019Met |
| ARDM-334 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | - | IVS38-10T>C | |
| ARDM-342 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 9 | c.1122C>T | p.Arg408X |
| ARDM-345 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 13 | c.1804C>T | p.Arg602Trp |
| ARDM-359 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 9 | c.1140T>A | p.Asn380Lys |
| | | | | 38 | c.5395A>G | p.Asn1799Asp |
| ARDM-360 | - | IVS28+4C>T | | - | IVS28+4C>T | |

Tabla 4.1. Familias STGD en las que se han identificado ambos alelos mutados en ABCA4.

| Familias con un alelo mutado (N=24/110) | | | | | | |
|---|-----------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 | | | Alelo 2 | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-166 | 46 | c.6320G>A | p.Arg2107His | | | |
| ARDM-181 | 22 | c.3323G>A | p.Arg1108His | | | |
| ARDM-183 | 44 | c.6079C>T | p.Leu2027Phe | | | |
| ARDM-197 | 34 | c.4793C>A | p.Ala1598Asp | | | |
| ARDM-205 | 35 | c.4919G>A | p.Arg1640Gln | | | |
| ARDM-213 | 13 | c.1804C>T | p.Arg602Trp | | | |
| ARDM-222 | 19 | c.2791G>A | p.Val931Met | | | |
| ARDM-225 | 42 | c.5882G>A | p.Gly1961Glu | | | |
| ARDM-240 | 42 | c.5882G>A | p.Gly1961Glu | | | |
| ARDM-243 | 45 | c.6148G>C | Val2050Leu | | | |
| ARDM-245 | - | IVS28+5 G>A | | | | |
| ARDM-257 | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs | | | |
| ARDM-258 | 29 | c.4283C>T | p.Thr1428Met | | | |
| ARDM-285 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | | | |

| Familias con un alelo mutado (N=24/110) | | | | | | |
|---|---------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 | | | Alelo 2 | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-286 | 21 | c.3056C>T | p.Thr1019Met | | | |
| ARDM-300 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | | | |
| ARDM-301 | 43 | c.5914G>A | p.Gly1972Arg | | | |
| ARDM-304 | 29 | c.4297G>A | p.Val1433Ile | | | |
| ARDM-308 | - | IVS28+4C>T | | | | |
| ARDM-318 | - | IVS28+5 G>A | | | | |
| ARDM-324 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | | | |
| ARDM-349 | 20 | c.2966T>C | p.Val989Ala | | | |
| ARDM-352 | 12 | c.1610G>A | p.Arg537His | | | |
| ARDM-354 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | | | |

Tabla 4.2. Familias STGD en las que únicamente se ha identificado un alelo mutante en *ABCA4*.

Todas las mutaciones identificadas por el microarray se confirmaron mediante secuenciación automática. Se identificaron cuatro posibles fallos:

- **Un falso positivo** en la familia **ARDM-197**

En la familia ARDM-197 el microarray detectó la mutación p.Ala1598Asp, pero al confirmar mediante secuenciación automática, dicha mutación no estaba presente.

- **Un falso positivo** en la familia **ARDM-178**, el chip detectó dos cambios de nucleótido en la misma posición del exón 46, después de confirmar mediante secuenciación automática, se determinó que la familia ARDM-178 presentaba la mutación p. Arg2107His pero no la mutación p. Arg2107Pro.

- **Un falso negativo en la familia ARDM-213**

En la familia ARDM-213 el chip detectó la mutación p.Arg602Trp en heterocigosis (Tabla 4.2) pero al confirmar mediante secuenciación automática se observa que en realidad la mutación se encuentra en homocigosis.

- **Un falso negativo en la familia ARDM-260**

En la familia ARDM-260 el chip detectó la mutación p.Arg602Trp en heterocigosis (Tabla 4.1) pero al confirmar mediante secuenciación automática se observa, igual que en el anterior caso, que en realidad la mutación se encuentra en homocigosis.

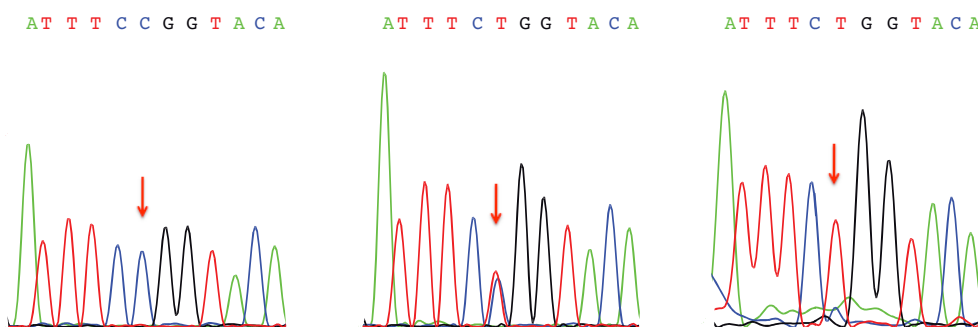


Figura 4.2. Secuencias del exón 13 del gen ABCA4. A) Secuencia silvestre; B) Secuencia con la mutación p.Arg602Trp en heterocigosis; C) Secuencia con la mutación p.Arg602Trp en homocigosis.

b) Distrofia de conos y bastones (DCB)

Se estudiaron un total de 36 familias con DCB, entre las cuales se identificaron:

- 10 familias con dos alelos mutados, 27,7%
- 6 familias con un alelo mutado, 16,7%
- 20 familias con ningún alelo mutado, 55,6%

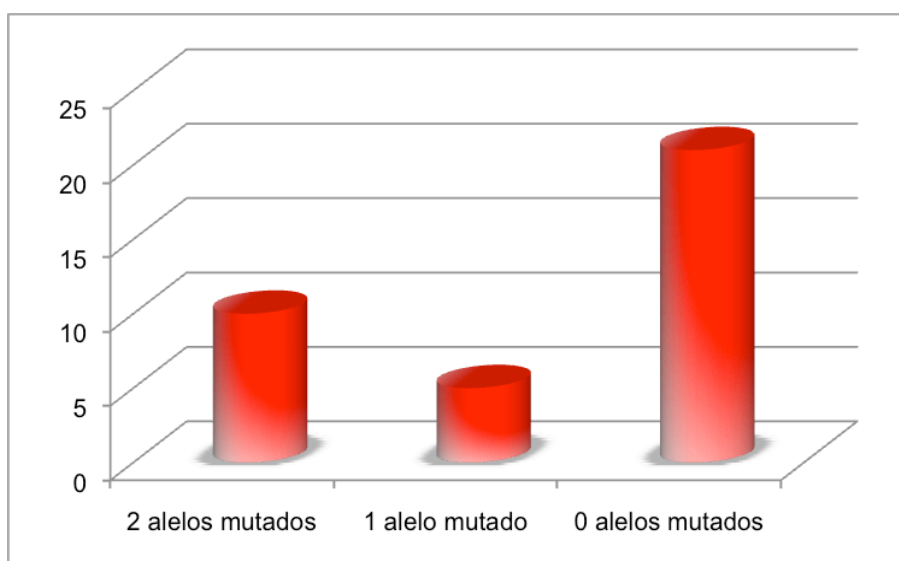


Figura 4.3. Las 36 familias DCB clasificadas en función de los alelos mutados identificados.

| Familias con dos alelos mutados (N=10/36) | | | | | | |
|---|---------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 | | | Alelo 2 | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-190 | 9 | c.1140T>A | p.Asn380Lys | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs |
| ARDM-206 | 35 | c.4926C>G | p.Ser1642Arg | - | IVS38-10 T>C | |
| | 36 | 5041 del 15 | p.VVAIC 1681 del | | | |
| ARDM-290 | 13 | c.1804C>T | p.Arg602Trp | 35 | c.4919G>A | p.Arg1640Gln |
| ARDM-295 | 43 | c.5917delG | FS | 43 | c.5917delG | FS |

| Familias con dos alelos mutados (N=10/36) | | | | | | |
|---|---------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 | | | Alelo 2 | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-299 | 1 | c.52C>T | p.Arg18Trp | 45 | c. 6179T>G | p.Leu2060Arg |
| ARDM-302 | 12 | c.1622T>C | p.Leu541Pro | 42 | c.5882G>A | p.Gly1961Glu |
| | 21 | c.3113C>T | p.Ala1038Val | | | |
| ARDM-336 | 44 | c.6088C>T | p.Arg2030X | 44 | c.6088C>T | p.Arg2030X |
| RP-741 | 43 | c.5917delG | FS | 43 | c.5917delG | FS |
| RP-998 | 14 | c.2041C>T | p.Arg681X | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs |
| RP-1126 | - | IVS26+1 G>A | | 46 | c.6329G>A | p.Trp2110X |

Tabla 4.3. Familias DCB en las que se han identificado ambos alelos mutados en ABCA4.

| Familias con un alelo mutado (N=6/36) | | | | | | |
|---------------------------------------|---------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 | | | Alelo 2 | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-247 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | | | |
| RP-532 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | | | |
| RP-766 | 15 | c.2300T>A | p.Val767Asp | | | |
| RP-1058 | 29 | c.4297G>A | p.Val1433Ile | | | |
| RP-1177 | 46 | c.6320G>C | p.Arg2107Pro | | | |
| RP-1354 | 48 | c.6529G>A | p.Asp2177Asn | | | |

Tabla 4.4. Familia DCB en las que se ha identificado un alelo mutado en ABCA4.

Las mutaciones identificadas por el microarray se comprobaron mediante secuenciación automática, no encontrándose ninguna discrepancia de detección.

Entre los 26 alelos mutados detectados en los pacientes con DCB, 12 (46%) de ellos eran interpretados como nulos. Cuatro eran mutaciones sin

sentido (p.Arg681X, p.Arg2030X en homocigosis y p.Trp2110X); seis producían cambios en la pauta de lectura, como la inserción: c.3211ins GT y las deleciones: c.2888delG, c.5917delG y p.VVAIC1681del; por último, dos afectaban al sitio de corte y empalme, IVS26+1 G>A afecta al sitio donador y IVS39-10 T>C afecta al sitio aceptor.

c) Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva (RPAR)

Se estudiaron un total de 31 familias con RPAR, entre las cuales se identificaron:

- 5 familias con un alelo mutante, 16,1%
- 26 familias sin ningún alelo mutante, 83,9%

No se identificó ninguna familia que fuese portadora de mutaciones en ambos alelos de *ABCA4*.

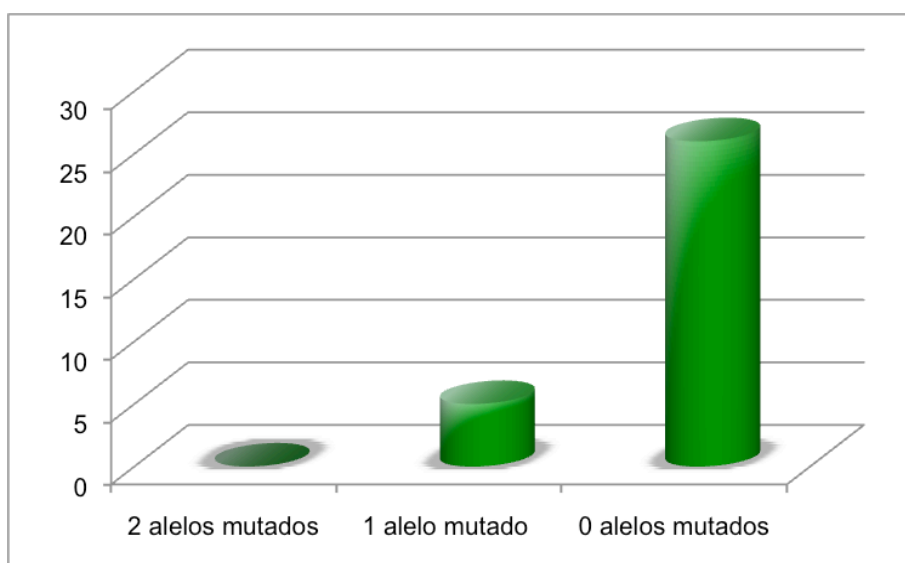


Figura 4.4. Las 31 familias RPAR clasificadas en función de los alelos mutantes identificados

| Familias con un alelo mutado | | | | | | |
|------------------------------|---------|----------------------|----------------------|---------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 | | | Alelo 2 | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| RP-17 | 18 | c.2701A>G | p. Thr901Ala | | | |
| RP-285 | 18 | c.2701A>G | p. Thr901Ala | | | |
| RP-407 | 27 | c.3899G>A | p.Arg1300Gln | | | |
| RP-759 | 17 | c.2588G>C | p.Gly863Ala | | | |
| RP-904 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | | | |

Tabla 4.5. Familias RPAR en las que se han identificado un alelo mutante en ABCA4.

Las mutaciones identificadas en estas familias se confirmaron por secuenciación automática, siendo correctas en todos los casos.

Entre los alelos mutados detectados no se ha identificado ninguna mutación considerada nula.

En la familia RP-285, los tres hermanos afectados presentan distinta segregación del alelo p.Thr901Ala como se observa en la figura 4.4, por lo tanto, esta mutación no es causante de la enfermedad, al menos en todos los afectados.

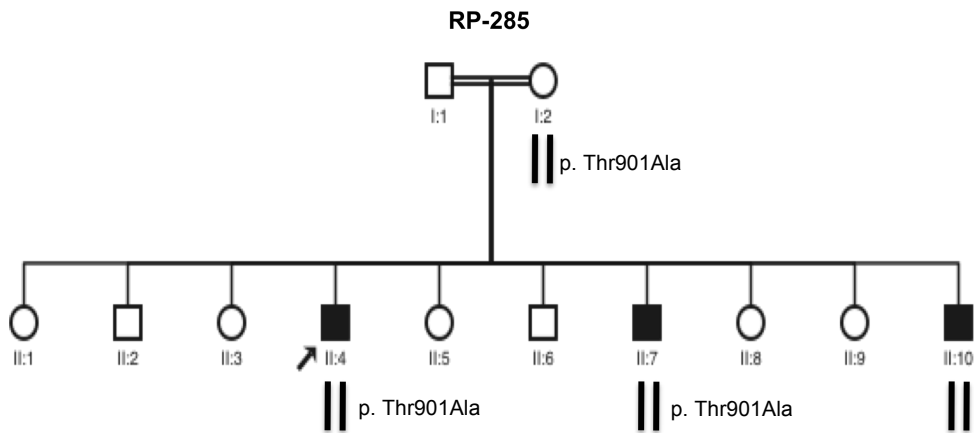


Figura 4.5. Arbol genealógico de la familia RP-285 donde se observa distinta segregación del alelo p.Thr901Ala en los afectados.

En la familia RP-904, el análisis de haplotipos determinó que en esta familia era posible descartar el gen *ABCA4* como responsable de la enfermedad, como se verá más adelante. Por lo que, el alelo p.Arg1129Leu, detectado mediante el microarray de genotipado, no es causante de la enfermedad en esta familia.

Sin embargo, en la familia RP-407 se detectó la mutación p.Arg1300Gln y mediante el análisis de haplotipos realizado no fue posible descartar el gen *ABCA4* como responsable de la enfermedad. Lo mismo sucede en la familia RP-759, en la cual se detectó la variante p.Gly863Ala y se determinó mediante el análisis de haplotipos la segregación con la enfermedad.

Estas dos familias son candidatas para los siguientes estudios que detallamos más adelante.

Las respectivas frecuencias de los alelos mutados para los 50 exones son: 54,5% (120/220) para STGD con 72 familias mutadas (48 con dos alelos mutados y 24 con un solo alelo mutado), 36.1% (26/72) para DCB con 16 familias mutadas (10 con dos alelos mutados y 6 con un solo alelo mutado) y 8.1% (5/62) para RPAR con 5 familias mutadas, todas ellas con un solo alelo mutado.

| Diagnóstico | Nº Fam | mt/mt | mt/wt | wt/wt | Alelos mutados | Familias Mutadas |
|--------------|------------|-------|-------|-------|-----------------|------------------|
| STGD | 110 | 48 | 24 | 38 | 120/220 (54,5%) | 72/110 (65,4%) |
| DCB | 36 | 10 | 6 | 20 | 26/72 (36,1%) | 16/36 (44,4%) |
| RPAR | 31 | 0 | 5 | 26 | 5/62 (8,1%) | 5/31 (16,1%) |
| TOTAL | 177 | 58 | 35 | 84 | 151/354(42,6%) | 93/177 (52,5%) |

Tabla 4.6. Las respectivas frecuencias de los alelos mutados y de las familias mutadas.

En el grupo de los 177 pacientes, se identificaron un total de 61 alelos mutados diferentes, en referencia al tipo de mutaciones, se observó que:

- la mayor parte de mutaciones producen un cambio en la proteína (41/61).
- 4 producen cambios en la pauta de lectura (4/61).
- 7 generan un codon de parada prematuro y, por tanto, una proteína truncada (7/61).
- 6 alteran los sitios donadores/aceptores del procesamiento de los intrones (6/61).
- 3 dobles alelos mutados (3/61).

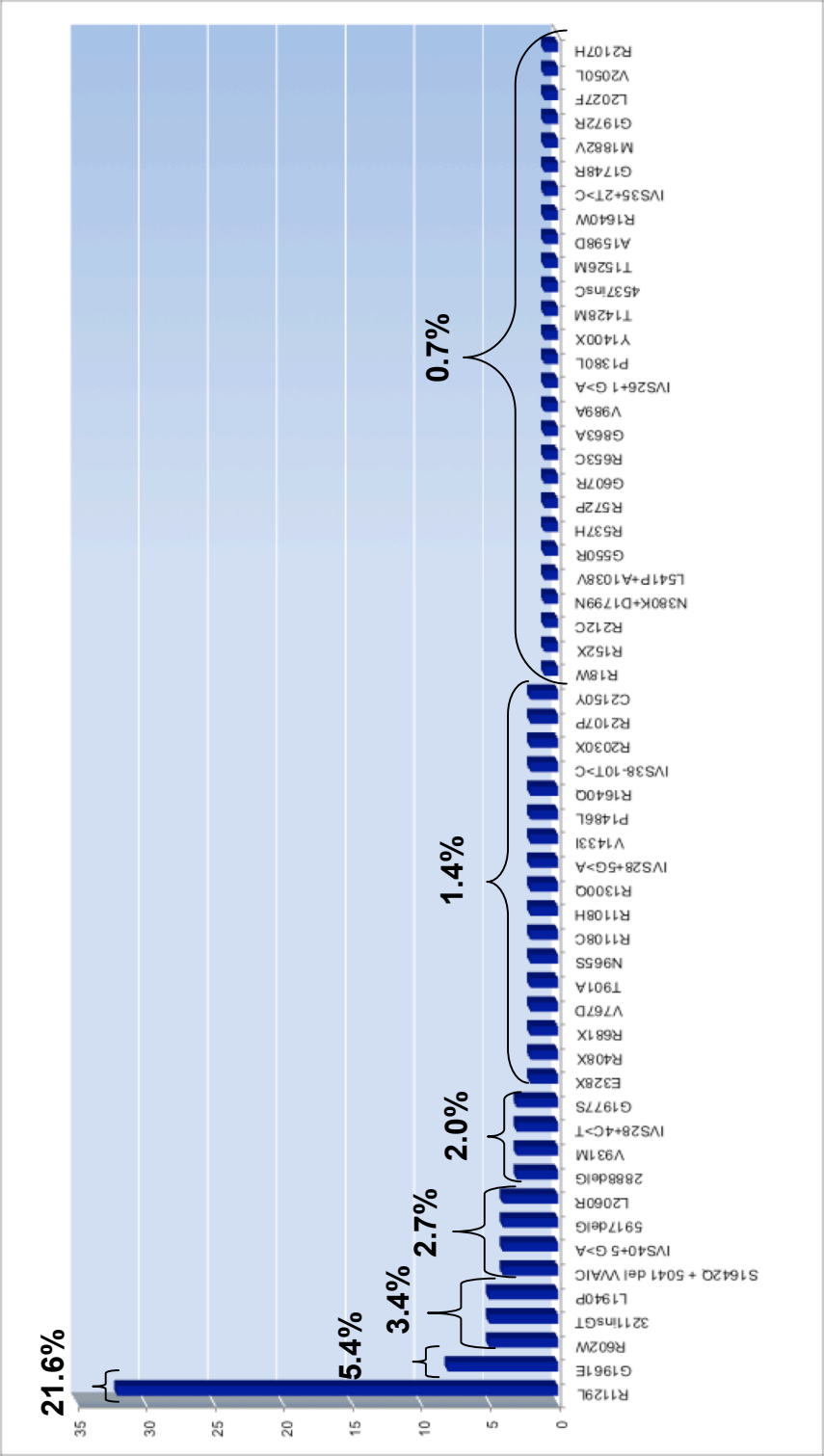


Figura 4.6. Representados el total de alelos diferentes (61) identificados en el gen ABCA4, así como sus respectivas frecuencias.

1.1.2.1- DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL MICROARRAY DE GENOTIPADO

Los procedimientos para evaluar cuantitativamente la eficacia de un proceso de diagnóstico son conocidos y se basan en determinar su capacidad para clasificar correctamente los sujetos en dos o más grupos. Se trata de determinar como se ajustan a la realidad los resultados obtenidos con la prueba diagnóstica, en nuestro caso saber cómo de fiable y eficaz es el chip de genotipado, para ello todas las mutaciones identificadas por el microarray se comprobaron mediante secuenciación automática y se identificaron 4 posibles fallos como hemos visto anteriormente (Ver pag. 87)

A continuación, calculamos la sensibilidad y especificidad del microarray:

| | | PRESENCIA DE PATOLOGÍA | | |
|--|---|------------------------------------|--|----------------------------|
| | | ALELO MUTADO | ALELO NO MUTADO (SANO) | |
| PRUEBA: MICROARRAY DE GENOTIPADO | DETECCION DE ALELO MUTADO | 146 | 2 | 148 |
| | DETECCION DE ALELO NO MUTADO (SANO) | 2 | 204 | 206 |
| | | TOTAL DE ALELOS MUTADOS= 148 | TOTAL DE ALELOS NO MUTADOS (SANOS)= 206 | TOTAL DE ALELOS= 354 |

SENSIBILIDAD, es la proporción de verdaderos alelos mutados detectados con el microarray de genotipado del total de alelos mutados.

$$\text{Sensibilidad} = S = \frac{146}{148} \times 100 = \underline{98,6 \%}$$

ESPECIFICIDAD, es la proporción de verdaderos alelos sanos o no mutados identificados con el microarray de genotipado del total de alelos no mutados.

$$\text{Especificidad} = E = \frac{204}{206} \times 100 = \underline{99,0 \%}$$

A continuación, aquellos pacientes con un alelo mutado y sin alelos mutados se analizaron mediante diferentes técnicas (dHPLC y HRM) con la finalidad de encontrar nuevas mutaciones en población española y, por último, se empleó la técnica de MLPA para descartar posibles deleciones o duplicaciones de gran tamaño en el gen *ABCA4*.

1.1.3- TÉCNICA DE dHPLC (denaturing High Performance Liquid Chromatography)

Se trata de la primera técnica de cribado empleada para la búsqueda de nuevas mutaciones en aquellos pacientes con tan solo uno o ningún alelo mutado. Se estudiaron un total de 55 familias. A continuación, se presentan los resultados por fenotipos.

a) Enfermedad de Stargardt (STGD)

Mediante esta técnica se estudiaron un total de 35 familias con STGD, entre las cuales, distinguimos:

- 24 familias con un alelo mutado
- 11 familias sin ningún alelo mutado

| Familias con un alelo mutado | | | | | | |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (microarray de genotipado) | | | Alelo 2 (técnica de dHPLC) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-65* | 42 | c.5882G>A | p.Gly1961Glu | | N/D | N/D |
| ARDM-75* | 48 | c.6721C>G | p.Leu2241Val | | N/D | N/D |
| ARDM-125* | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs | 40 | c.5629 dup 15 | p.KNLFA1876 dup |
| ARDM-135* | 42 | c.5882G>A | p.Gly1961Glu | 8 | c.1029_1030 insT | p.Asn344fsX |
| ARDM-146* | 21 | c.3056C>T | p.Thr1019Met | 44 | c.6140T>A | p.Ile2047Asn |
| ARDM-158* | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs | 30 | c.4537delC | p.Gln1513fsX 1525 |
| ARDM-162* | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | | N/D | N/D |
| ARDM-163* | 30 | c.4457C>T | p.Pro1486Leu | | N/D | N/D |
| ARDM-164* | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 6 | c.700C>T | p.Gln234X |
| ARDM-165* | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs | | N/D | N/D |
| ARDM-167* | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs | | N/D | N/D |
| RP-773* | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | | N/D | N/D |
| ARDM-166 | 46 | c.6320G>A | p.Arg2107His | | N/D | N/D |
| ARDM-181 | 22 | c.3323G>A | p.Arg1108His | - | IVS38+5G>A | |
| ARDM-183 | 44 | c.6079C>T | p.Leu2027Phe | 43 | c.5929G>A | p.Gly1977Ser |
| ARDM-197 | 34 | c.4793C>A | p.Ala1598Asp | 36 | c.5172G>T | p.Trp1724Cys |

| Familias con un alelo mutado | | | | | | |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (microarray de genotipado) | | | Alelo 2 (técnica de dHPLC) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-205 | 35 | c.4919G>A | p.Arg1640Gln | | N/D | N/D |
| ARDM-222 | 19 | c.2791G>A | p.Val931Met | | N/D | N/D |
| ARDM-225 | 42 | c.5882G>A | p.Gly1961Glu | 48 | c.6559C>T | p.Gln2187X |
| ARDM-240 | 42 | c.5882G>A | p.Gly1961Glu | 15 | c.2285C>A | p.Ala762Glu |
| ARDM-245 | - | IVS28+5 G>A | | | N/D | N/D |
| ARDM-257 | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs | | N/D | N/D |
| ARDM-285 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | | N/D | N/D |
| ARDM-286 | 21 | c.3056C>T | p.Thr1019Met | | N/D | N/D |

Tabla 4.7. Familias STGD con un alelo mutado estudiadas con la técnica de dHPLC.

* Familias pertenecientes a un estudio previo.

Alelo 1=mutación detectada mediante el microarray de genotipado.

Alelo 2=mutación detectada mediante el dHPLC.

N/D: mutación no determinada.

| Familias sin ningún alelo mutado | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (técnica de dHPLC) | | | Alelo 2 (técnica de dHPLC) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-67* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-83* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-84* | 47 | c.6410G>A | p.Cys2137Tyr | 47 | c.6410G>A | p.Cys2137Tyr |
| ARDM-122* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-160* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-173 | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-182 | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-186 | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-209 | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-236 | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-248 | 19 | c.2861A>C | p.Tyr954Ser | | N/D | N/D |

Tabla 4.8. Familias STGD sin ningún alelo mutado identificado estudiadas con el dHPLC.

* Familias pertenecientes a un estudio previo.

N/D: mutación no determinada.

Mediante el análisis con la técnica de dHPLC se pudo detectar un posible fallo:

- **Un falso negativo** en la familia ARDM-183.

En esta familia, el chip no detectó la mutación p.Gly1977Ser que sí fue detectada por la técnica de dHPLC.

Debido a la detección de un nuevo falso negativo, el valor de Sensibilidad del microarray de genotipado ha variado con respecto al determinado anteriormente. Recordando que la Sensibilidad es la proporción de verdaderos alelos mutados detectados del total de alelos mutados, determinamos su nuevo valor que se indica a continuación:

$$\text{Sensibilidad} = S = \frac{146}{149} \times 100 = \underline{97,9 \%}$$

En el caso de la Especificidad se mantiene el mismo valor de 99,0%

b) Distrofia de conos y bastones (DCB)

Mediante esta técnica se estudiaron un total de 15 familias, entre las cuales, distinguimos:

- 8 familias con un alelo mutado
- 7 familias sin ningún alelo mutado

| Familias con un alelo mutado | | | | | | |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (microarray de genotipado) | | | Alelo 2 (técnica de dHPLC) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-99* | 29 | c.4297G>A | p.Val1433Ile | | N/D | N/D |
| ARDM-131* | 18 | c.2701A>G | p. Thr901Ala | | N/D | N/D |
| ARDM-174* | 35 | c.4918C>T | p.Arg1640Trp | - | IVS44+2T>A | |
| RP-577* | 9 | c.1140T>A | p.Asn380Lys | | N/D | N/D |
| RP-959* | 5 | c.466A>G | p.Ile156Val | | N/D | N/D |
| ARDM-247 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 47 | c.6410G>A | p.Cys2137Tyr |
| RP-766 | 15 | c.2300T>A | p.Val767Asp | | N/D | N/D |
| RP-1058 | 29 | c.4297G>A | p.Val1433Ile | | N/D | N/D |

Tabla 4.9. Familias DCB con un alelo mutado estudiadas con la técnica de dHPLC.

* Familias pertenecientes a un estudio previo.

Alelo 1=mutación detectada mediante el microarray de genotipado.

Alelo 2=mutación detectada mediante dHPLC.

N/D: mutación no determinada.

| Familias sin ningún alelo mutado | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (técnica de dHPLC) | | | Alelo 2 (técnica de dHPLC) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-49* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-100* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-142* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| RP-763* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| RP-964* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-177 | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| ARDM-195 | | N/D | N/D | | N/D | N/D |

Tabla 4.10. Familias DCB sin ningún alelo mutado identificado estudiadas con el dHPLC.

* Familias pertenecientes a un estudio previo

N/D: mutación no determinada

c) Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva (RPAR)

Mediante esta técnica se estudiaron un total de 5 familias, entre las cuales, distinguimos:

- 2 familias con un alelo mutado
- 3 familias sin ningún alelo mutado

| Familias con un alelo mutado | | | | | | |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (microarray de genotipado) | | | Alelo 2 (técnica de dHPLC) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| RP-775* | 5 | c.466A>G | p.Ile156Val | | N/D | N/D |
| RP-834* | - | IVS40+5 G>A | | | N/D | N/D |

Tabla 4.11. Familias RPAR con un alelo mutado estudiadas con la técnica de dHPLC.

* Familias pertenecientes a un estudio previo

Alelo 1=mutación detectada mediante el microarray de genotipado

Alelo 2=mutación detectada mediante dHPLC

N/D: mutación no determinada

| Familias sin ningún alelo mutado | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (técnica de dHPLC) | | | Alelo 2 (técnica de dHPLC) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| RP-716* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| RP-818* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| RP-854* | | N/D | N/D | | N/D | N/D |

Tabla 4.12. Familias RPAR sin ningún alelo mutado identificado estudiadas con el dHPLC.

* Familias pertenecientes a un estudio previo

N/D: mutación no determinada

El análisis realizado con el dHPLC y posterior confirmación mediante secuenciación automática permitió la identificación de 35 cambios adicionales en el gen *ABCA4*.

Seis de estos cambios eran interpretados como mutaciones nulas: dos eran mutaciones sin sentido (p.Gln234X, p.Gln2187X); dos mutaciones en el sitio donador (IVS38+5G>A y IVS44+2T>A); dos variantes que producen cambios en la pauta de lectura: una inserción (c.1029_1030insT) y una duplicación de 5 aminoácidos (p.KNLFA1876 dup), la cual pudimos determinar que era de herencia materna (Ver tablas 4.7 y 4.9).

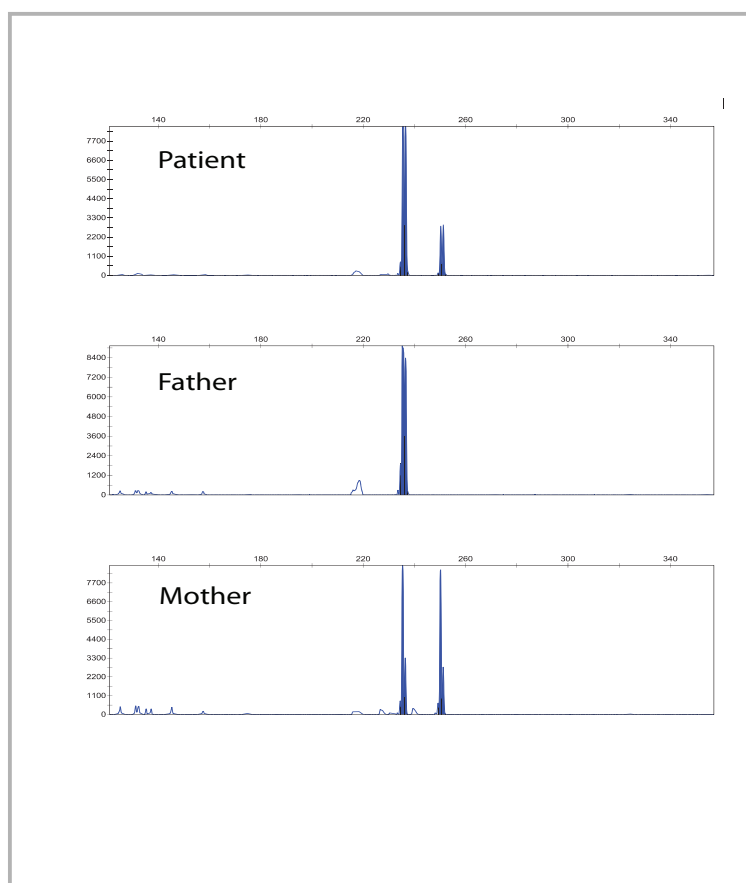


Figura 4.7. Electroferograma que muestra la duplicación de 5 aminoácidos de la familia ARDM-125.

Finalmente, se detectaron 4 cambios no sinónimos (p.Ala762Glu, p.Tyr954Ser, p.Ile2047Asn y p.Cys2137Tyr) en los pacientes pero no en 100 cromosomas controles (Ver tablas 4.7, 4.8 y 4.9). La mutación (p.Ile2047Asn) se analizó mediante una digestión con la enzima de restricción *TaqI*. Mientras realizábamos el estudio de controles de la mutación p.Cys2137Tyr identificamos un nuevo cambio p.Ile2142Val en heterozigosis. Esta variante no ha sido descrita ni encontrada previamente en pacientes españoles con STGD y/o DCB. Además, se detectaron 2 mutaciones previamente descritas (c.4537delC y p.Trp1724Cys), no incluidas en el array en el momento del análisis y un falso negativo (p.Gly1977Ser) (Ver tabla 4.7).

Algunos de los cromatogramas obtenidos con la técnica de dHPLC y los fragmentos de las secuencias donde se identifica la nueva mutación se muestran en la siguiente figura:

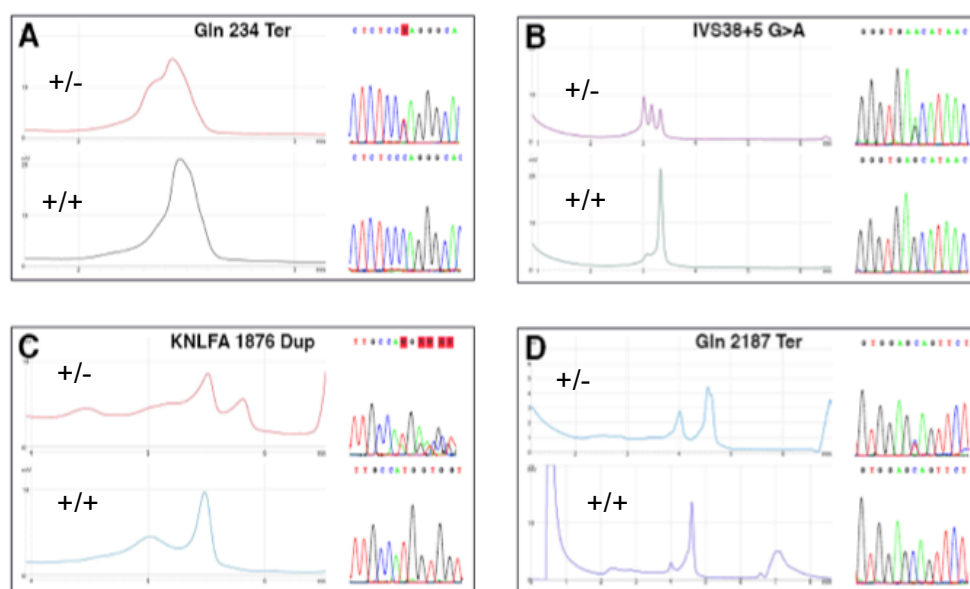


Figura 4.8. Cromatogramas del dHPLC y fragmentos de las secuencias *forward* (sentido) donde se encuentra la nueva mutación.

Los cromatogramas muestran diferencias entre la muestra control (+/+) y la muestra mutada (+/-). La muestra control da lugar a un único pico, sin embargo en la muestra mutada se observan múltiples picos. En algunos casos la diferencia entre la muestra control y la mutada es muy significativa (Figura 4.8B, 4.8C, 4.8D) pero en otros casos no es así (Figura 4.8A).

Además de estos alelos mutados asociados a la enfermedad, otros cambios interpretados como no patogénicos fueron también identificados con la técnica de dHPLC y confirmados mediante secuenciación automática (Tabla 4.13). Entre ellos, un nuevo cambio en el exón 12 (p.Val552Ile) que fue encontrado en la familia ARDM-100 diagnosticado de DCB, no así en la hermana sana. Para determinar si este cambio era realmente una mutación estudiamos 200 cromosomas y esta variante fue detectada en 2 de ellos sugiriéndonos que este cambio debía ser un polimorfismo. También encontramos 6 variantes que no producían un cambio a nivel de la proteína, 5 de ellas nuevas, y 12 variantes intrónicas, 5 de ellas no reportadas antes. El empleo de una herramienta bioinformática (www.cbs.dtu.dk/services) determinó que estas 5 variantes intrónicas nuevas no afectaban al sitio de corte y empalme de los intrones.

Todos estos cambios se indican en la siguiente tabla:

| Exon | Cambio de Nucleotido | Cambio de Secuencia | Referencia |
|------|-----------------------|---------------------|---|
| 3 | c.264 A>T | p.Gly88Gly | Este estudio |
| | IVS2-27G>A | | Este estudio |
| | IVS3+26 A>G | | Shroyer <i>et al.</i> , 2001, Webster <i>et al.</i> , 2001, Briggs <i>et al.</i> , 2001 |
| | IVS6-32 T>C | | Shroyer <i>et al.</i> , 2001, Webster <i>et al.</i> , 2001 |
| 8 | c.1029T>C | p.Asn343Asn | Este estudio |
| 10 | c.1299A>G | p.Glu433Glu | Este estudio |
| 12 | c.1654G>A | p.Val552Ile | Este estudio |
| | IVS12+22G>T | | Webster <i>et al.</i> , 2001 |
| | IVS13+16G>A | | Este estudio |
| | IVS14+46T>C | | Este estudio |
| 19 | c.2832A>G | p.Pro944Pro | Este estudio |
| 20 | c.2964C>T | p.Leu988Leu | Briggs <i>et al.</i> , 2001 |
| 23 | c.3507G>A | p.Gln1169Gln | Este estudio |
| | IVS28+13G>A | | Este estudio |
| | IVS28+43G>A | | Fumagalli <i>et al.</i> , 2001 |
| | IVS43-16G>A | | Papaioannou <i>et al.</i> , 2000 |
| | IVS45+7G>A | | Papaioannou <i>et al.</i> , 2000, Webster <i>et al.</i> , 2001, Briggs <i>et al.</i> , 2001 |
| | IVS48+39T>A | | Este estudio |
| | IVS48-3T>C | | Webster <i>et al.</i> , 2001, Briggs <i>et al.</i> , 2001 |

Tabla 4.13. Polimorfismos proteicos y no proteicos detectados con el dHPLC.

1.1.4- TÉCNICA DE HRM (High Resolution Melting)

Se trata de la segunda técnica de cribado empleada para la búsqueda de nuevas mutaciones en aquellos pacientes con tan solo uno o ningún alelo mutado. Se estudiaron las mismas 55 familias estudiadas con la técnica de dHPLC con la finalidad de comparar los dos análisis.

Mediante la novedosa técnica de HRM y posterior confirmación mediante secuenciación automática se identificó una nueva mutación (p.Arg187His), no detectada en 100 cromosomas controles, en las familias ARDM-167 y ARDM-257, que la técnica de dHPLC no fue capaz de detectar y que curiosamente presentaban la misma mutación detectada mediante el microarray.

En la familia ARDM-163, la técnica de HRM permitió la detección de la mutación (p.Trp1724Cys), cambio que, este caso, no fue identificado mediante la técnica de dHPLC, ya que anteriormente fue capaz de detectarlo en la familia ARDM-197 (Ver tabla 4.7)

| Familias con un alelo mutado | | | | | | |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (microarray de genotipado) | | | Alelo 2 (técnica de HRM) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-163* | 30 | c.4457C>T | p.Pro1486Leu | 36 | c.5172G>T | p.Trp1724Cys |
| ARDM-167* | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs | 5 | c.560G>A | p.Arg187His |
| ARDM-257 | 22 | c.3211ins GT | p.Ser1071fs | 5 | c. 560G>A | p.Arg187His |

Tabla 4.14. Familias STGD con un alelo mutado estudiadas con la técnica de HRM.

* Familias pertenecientes a un estudio previo.

Alelo 1=mutación detectada mediante el microarray de genotipado.

Alelo 2=mutación detectada mediante el HRM.

Observaciones: En la familia ARDM-257, se trata de un doble alelo mutado como se vera a continuación.

En las familias ARDM-163 y ARDM-257, además del caso índice también contábamos con hermanos del paciente, por lo que se realizó el análisis de haplotipos.

En la familia ARDM-163 comprobamos la segregación de los alelos mutados hallados en el paciente como se puede observar en la figura 4.9.

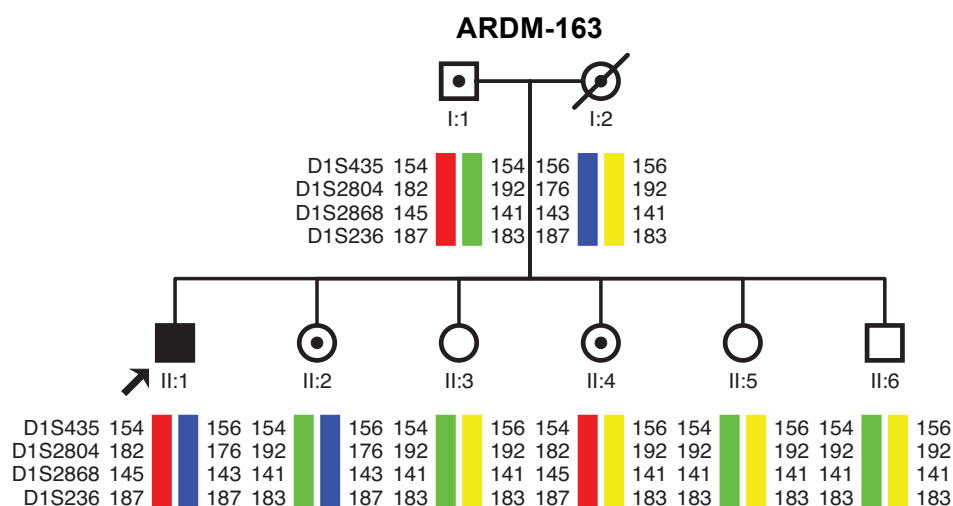


Figura 4.9. Árbol genealógico de la familia ARDM-163 en el que se muestra la segregación de los alelos mutados en ABCA4.

Sin embargo, en la familia ARDM-257, mediante secuenciación automática de los exones 5 y 22, en los cuales se detectaron las mutaciones p.Arg187His y c.3211insGT y, posterior análisis de haplotipos, se determinó que se trataba de un doble alelo mutado (rojo). La hermana (II:7) portadora de los alelos verde y amarillo no presenta ninguna de las mutaciones, en cambio, todos los hermanos, incluido el probandus, portadores del haplotipo rojo y verde presentan ambas mutaciones. De esta manera, determinamos que se trata de un doble alelo mutado. Por lo que, es muy probable que el paciente de la familia ARDM-167 también sea portador de un doble alelo mutado pero en esta familia solo contábamos con el caso índice por lo que no se pudo confirmar.

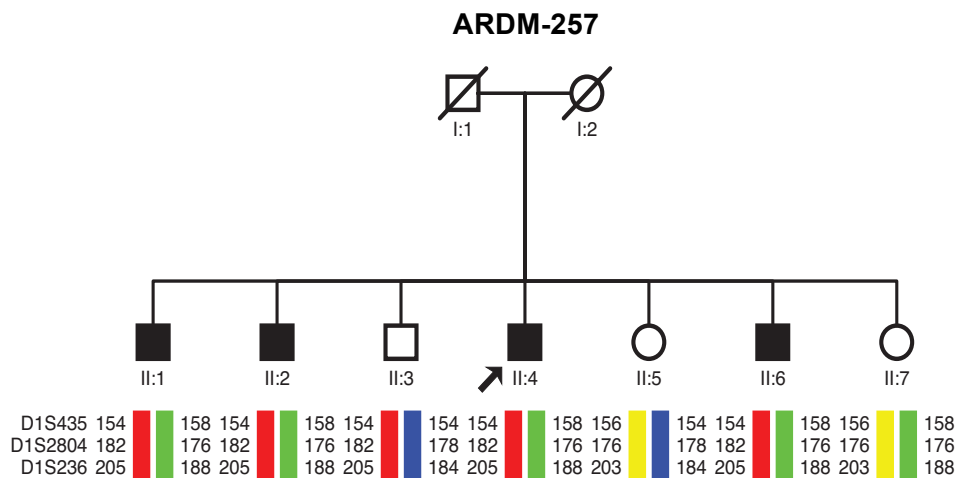


Figura 4.10. Árbol genealógico de la familia ARDM-257.

A continuación se muestran las curvas de *melting* normalizadas del exon 5 donde se observa una diferencia entre las muestras que presentan la mutación (p.Arg187His) y la muestra control:

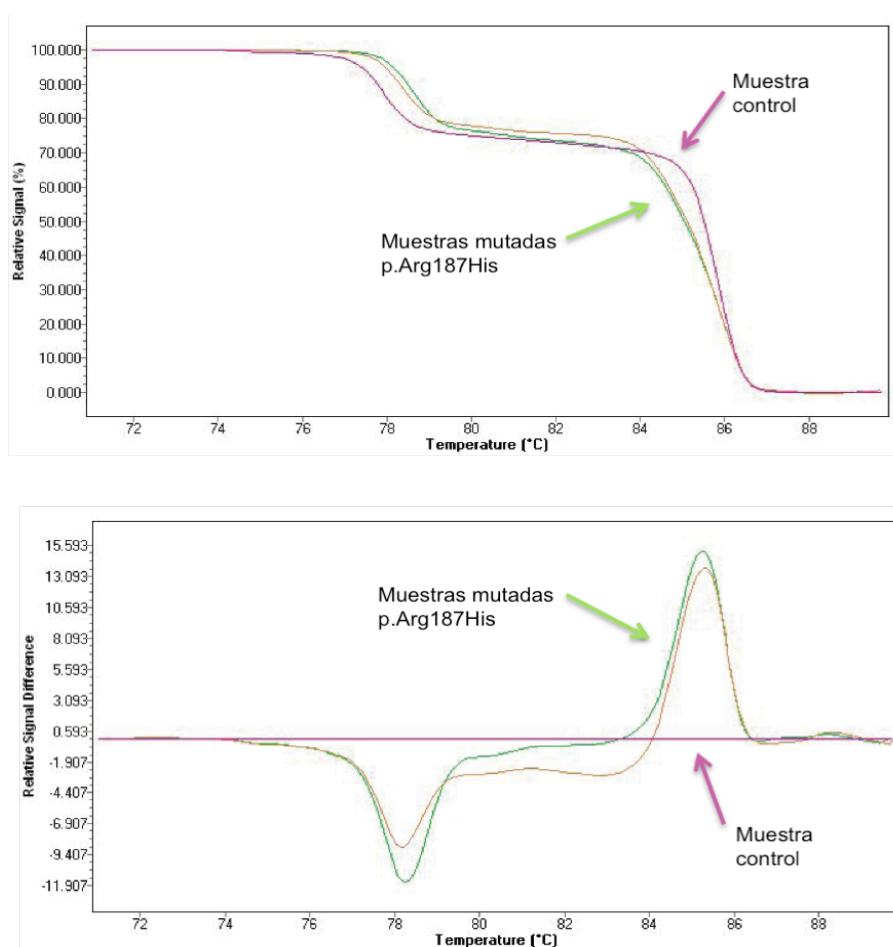


Figura 4.11. Representación gráfica de las curvas de *melting* del exon 5.

Con el fin de comparar las dos técnicas de cribado y determinar cuál de ellas es más sensible y específica, resumimos en la siguiente tabla las mutaciones detectadas en las 55 familias estudiadas por ambas metodologías:

| Familia | Nueva mutación | | | Técnica de dHPLC | Técnica de HRM |
|-----------|----------------|----------------------|-----------------------------|------------------|----------------|
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | | |
| ARDM-84* | 47 | c.6410G>A | p.Cys2137Tyr ⁽¹⁾ | ✗ | ✓ |
| ARDM-125* | 40 | c.5629 dup 15 | p.KNLFA1876dup | ✓ | ✓ |
| ARDM-135* | 8 | c.1029_1030insT | p.Asn344fsX | ✓ | ✗ |
| ARDM-146* | 44 | c.6140T>A | p.Ile2047Asn | ✓ | ✓ |
| ARDM-158* | 30 | c.4537delC | p.Gln1513fsX1525 | ✓ | ✓ |
| ARDM-163* | 36 | c.5172G>T | p.Trp1724Cys | ✗ | ✓ |
| ARDM-164* | 6 | c.700C>T | p.Gln234X | ✓ | ✓ |
| ARDM-167* | 5 | c.560G>A | p.Arg187His | ✗ | ✓ |
| ARDM-174* | - | IVS44+2T>A | - | ✓ | ✓ |
| ARDM-181 | - | IVS38+5G>A | - | ✓ | ✓ |
| ARDM-183 | 43 | c.5929G>A | p.Gly1977Ser | ✓ | ✓ |
| ARDM-197 | 36 | c.5172G>T | p.Trp1724Cys | ✓ | ✓ |
| ARDM-225 | 48 | c.6559C>T | p.Gln2187X | ✓ | ✓ |
| ARDM-240 | 15 | c.2285C>A | p.Ala762Glu | ✓ | ✓ |
| ARDM-247 | 47 | c.6410G>A | p.Cys2137Tyr ⁽²⁾ | ✓ | ✓ |
| ARDM-248 | 19 | c.2861A>C | p.Tyr954Ser | ✓ | ✓ |
| ARDM-257 | 5 | c.560G>A | p.Arg187His | ✗ | ✓ |

Tabla 4.15. Comparación de las técnicas de dHPLC y HRM respecto a la detección de mutaciones.

* Familias pertenecientes a un estudio previo.

⁽¹⁾ Familia que presenta la mutación en homocigosis.

⁽²⁾ Familia que presenta la mutación en heterocigosis.

✓: mutación detectada ✗: mutación no detectada

En la familia ARDM-135, la mutación (c.1029_1030insT) fue detectada por el dHPLC, pero no fue posible identificarla mediante la técnica del HRM. A continuación se muestran los patrones de picos obtenidos con la técnica de dHPLC y las curvas de *melting* obtenidas con el HRM:

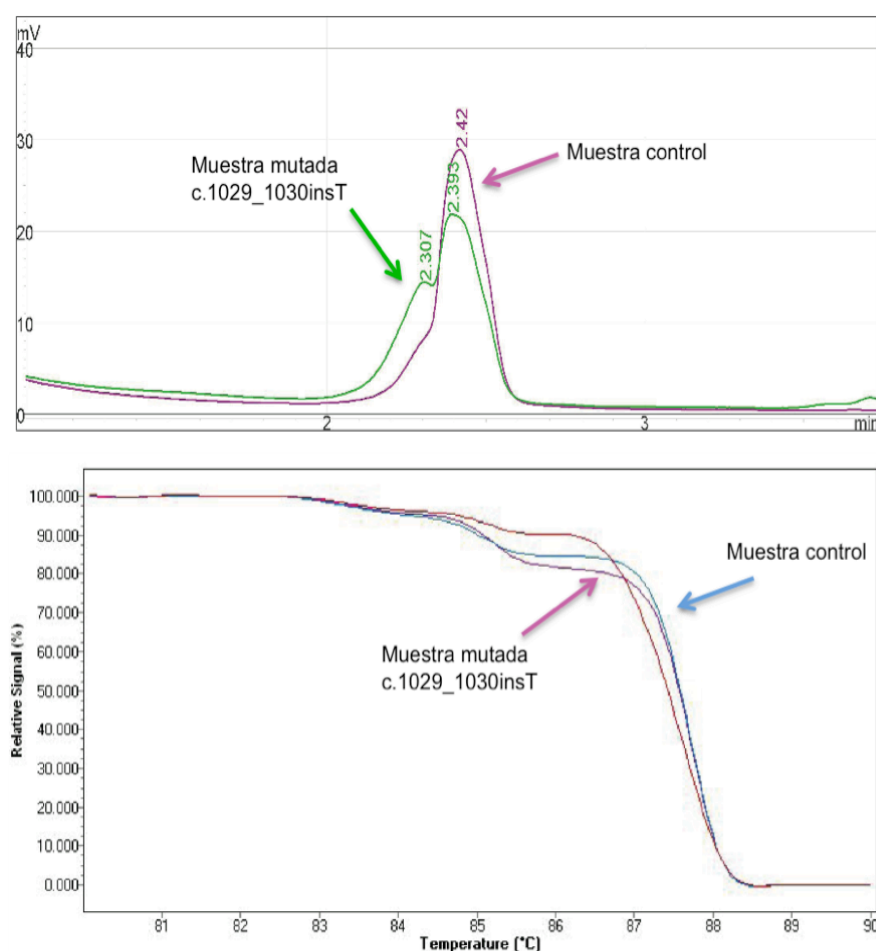


Figura 4.12. Empleo de dHPLC y HRM en la detección de la mutación nueva (c.1029_1030insT) en el exon 8 del gen *ABCA4*. Existe una diferencia en el patrón de picos obtenido con el dHPLC (arriba) entre la muestra control y la muestra mutada, sin embargo, esta diferencia no fue observada cuando se analizaron las curvas de *melting* obtenidas con el HRM (abajo).

En las familias ARDM-167 y ARDM-257, el HRM fue capaz de detectar una nueva mutación (p.Arg187His) que el dHPLC no identificó. En la siguiente figura se muestran los cromatogramas del dHPLC y las curvas de *melting* del HRM:

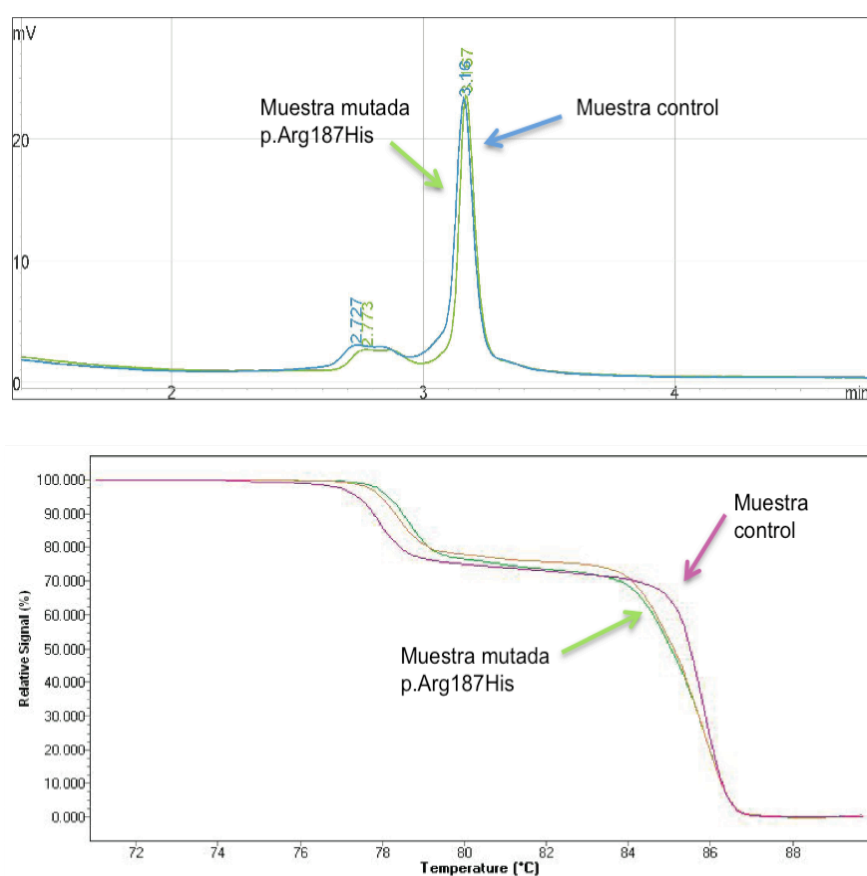


Figura 4.13. Empleo de dHPLC y HRM en la detección de la nueva mutación (p.Arg187His) en el exon 5 del gen *ABCA4*. El cromatograma obtenido mediante el dHPLC (arriba) no muestra diferencia entre la muestra control y la muestra mutada, sin embargo, se observa diferencia entre las curvas de *melting* de la muestra control y de la muestra mutada obtenidas con el HRM (abajo).

En la familia ARDM-247, que presenta la mutación (p.Cys2137Tyr) en heterocigosis, tanto la técnica de dHPLC como la técnica de HRM fueron capaces de detectar dicha mutación. Sin embargo, en la familia ARDM-84, que presenta la mutación (p.Cys2137Tyr) en homocigosis, tan solo el HRM es capaz de discriminar cuando comparamos con una muestra control, ya que el dHPLC solo puede discriminar las muestras que presentan un cambio en heterocigosis. Aunque para evitar esta limitación todas las muestras se mezclaron con un control negativo, para de esta manera, obtener las formas heteroduplex.

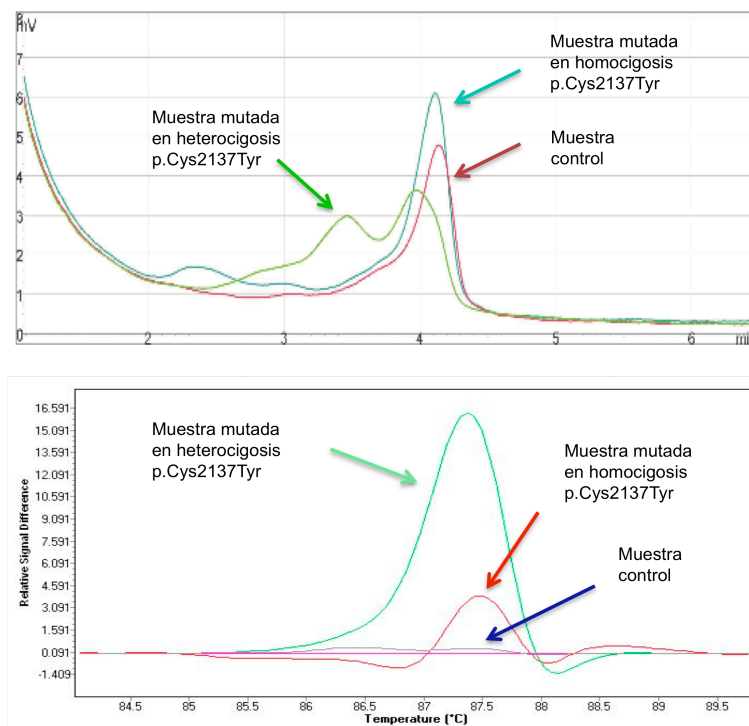


Figura 4.14. Empleo de dHPLC y HRM en la detección de la nueva mutación (p.Cys2137Tyr) en el exon 47 del gen *ABCA4*. El cromatograma obtenido mediante el dHPLC (arriba) no muestra diferencia entre la muestra control y la muestra mutada en homocigosis, a no ser que previamente se mezcle con un control negativo, sin embargo, se observa diferencia entre las curvas de *melting* (abajo) de la muestra mutada en heterocigosis y de la muestra mutada en homocigosis, diferenciándose a su vez de la muestra control.

Para determinar que técnica es más válida para el estudio molecular del gen *ABCA4*, se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

| | dHPLC | HRM |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Nº de mutaciones nuevas detectadas | 13 | 16 |
| Detecta mutaciones en homocigosis | No | Si |
| Tiempo requerido: Procesamiento | ≈ 13 horas/96 muestras | ≈ 1h30min/96 muestras |
| Nº de muestras procesadas por ensayo | 96 | 96 |
| Aparataje específico requerido | Termociclador + dHPLC | HRM |

Tabla 4.16. Comparación de distintas técnicas en el estudio del gen *ABCA4*.

Respecto a los resultados, el HRM detecta mayor número de mutaciones, y es capaz de discriminar mutaciones en homocigosis sin tener que mezclar previamente con un control negativo como sucedía con el dHPLC. Además, con el HRM el tiempo requerido para el procesamiento y análisis de resultados es menor, no es necesario el empleo de otro tipo de aparataje y el rendimiento es mayor. Por ello se decidió abordar el estudio de 14 familias más, empleando únicamente la técnica de HRM.

Los resultados obtenidos en estas 14 familias se presentan por fenotipos:

a) Enfermedad de Stargardt (STGD)

Se estudiaron 8 familias, entre las cuales distinguimos:

- 6 familias con un alelo mutado
- 2 familias sin ningún alelo mutado

| Familias con un alelo mutado | | | | | | |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (microarray de genotipado) | | | Alelo 2 (técnica de HRM) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-258 | 29 | c.4283C>T | p.Thr1428Met | | N/D | N/D |
| ARDM-300 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 39 | c.5549T>C | p.Leu1850Pro |
| ARDM-301 | 43 | c.5914G>A | p.Gly1972Arg | | N/D | N/D |
| ARDM-304 | 29 | c.4297G>A | p.Val1433Ile | | N/D | N/D |
| ARDM-308 | - | IVS28+4C>T | | 12 | c.1592A>G | p.Glu531Gly |
| ARDM-318 | - | IVS28+5G>A | | | N/D | N/D |

Tabla 4.17. Familias STGD con un alelo mutado estudiadas solo con la técnica de HRM.

| Familias sin ningún alelo mutado | | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (técnica de HRM) | | | Alelo 2 (técnica de HRM) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| ARDM-259 | 16 | c.2521C>A | p.Gln841Lys | | N/D | N/D |
| ARDM-296 | | N/D | N/D | | N/D | N/D |

Tabla 4.18. Familias STGD sin ningún alelo mutado estudiadas solo con la técnica de HRM.

El análisis realizado con el HRM permitió la identificación de 3 cambios adicionales en el gen *ABCA4*. Estos cambios eran confirmados mediante

secuenciación automática. Todos los cambios eran interpretados como mutaciones no sinónimas (p.Leu1850Pro, p.Glu531Gly y p.Gln841Lys) en los pacientes y no eran detectados en 100 cromosomas controles.

b) Distrofia de conos y bastones (DCB)

Se estudiaron 4 familias, entre las cuales, distinguimos:

- 2 familias con un alelo mutado
- 2 familias sin ningún alelo mutado

| Familias con ningún alelo mutado | | | | | | |
|----------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (microarray de genotipado) | | | Alelo 2 (técnica de HRM) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| RP-532 | 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | 38 | c.5318C>T | p.Ala1773Val |
| RP-1177 | 46 | c.6320G>C | p.Arg2107Pro | | N/D | N/D |

Tabla 4.19. Familias DCB con un alelo mutado estudiadas solo con la técnica de HRM.

| Familias sin ningún alelo mutado | | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (técnica de HRM) | | | Alelo 2 (técnica de HRM) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| RP-927 | | N/D | N/D | | N/D | N/D |
| RP-1205 | | N/D | N/D | | N/D | N/D |

Tabla 4.20. Familias DCB sin ningún alelo mutado estudiadas solo con la técnica de HRM.

El análisis realizado con el HRM y confirmación por secuenciación permitió la identificación de un cambio adicional en el gen *ABCA4*. El cambio era interpretado como mutación no sinónima (p.Ala1773Val) en el paciente y no era detectado en 100 cromosomas controles.

c) Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva (RPAR)

Se estudio una familia con un alelo mutado:

| Familias con un alelo mutado | | | | | | |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Familia | Alelo 1 (microarray de genotipado) | | | Alelo 2 (técnica de dHPLC) | | |
| | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Exón | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido |
| RP-759 | 17 | c.2588G>C | p.Gly863Ala | | N/D | N/D |

Tabla 4.21. Familia RPAR con un alelo mutado estudiada solo con la técnica de HRM.

La técnica de HRM permitió la identificación de 4 nuevos cambios asociados a la enfermedad. De esta manera se completó el diagnóstico en 2 pacientes con STGD y en un paciente con DCB.

1.1.5- TÉCNICA DE MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Esta técnica ha sido empleada para detectar pérdidas (deleciones) o ganancias (duplicaciones) grandes de material genético.

Mediante esta técnica se estudiaron un total de 50 familias. Se trata de aquellos pacientes a los que no se pudo identificar los dos alelos mutados mediante las técnicas de microarray de genotipado, dHPLC y HRM.

Los resultados de este análisis molecular en estos pacientes, permitieron descartar posibles deleciones o duplicaciones de material genético en el cromosoma 1p, región cromosómica donde se encuentra localizado el gen *ABCA4*.

Sin embargo, esta técnica nos permitió confirmar una nueva mutación (p.Gln841Lys) en el exon 16 del gen *ABCA4* en la familia ARDM-259 previamente detectada con la técnica de HRM (Ver tabla 4.18), ya que este cambio se localiza en la región diana donde hibrida la sonda, de manera que se observa un pico más bajo cuando se compara con una muestra control, como se observa en la siguiente figura:

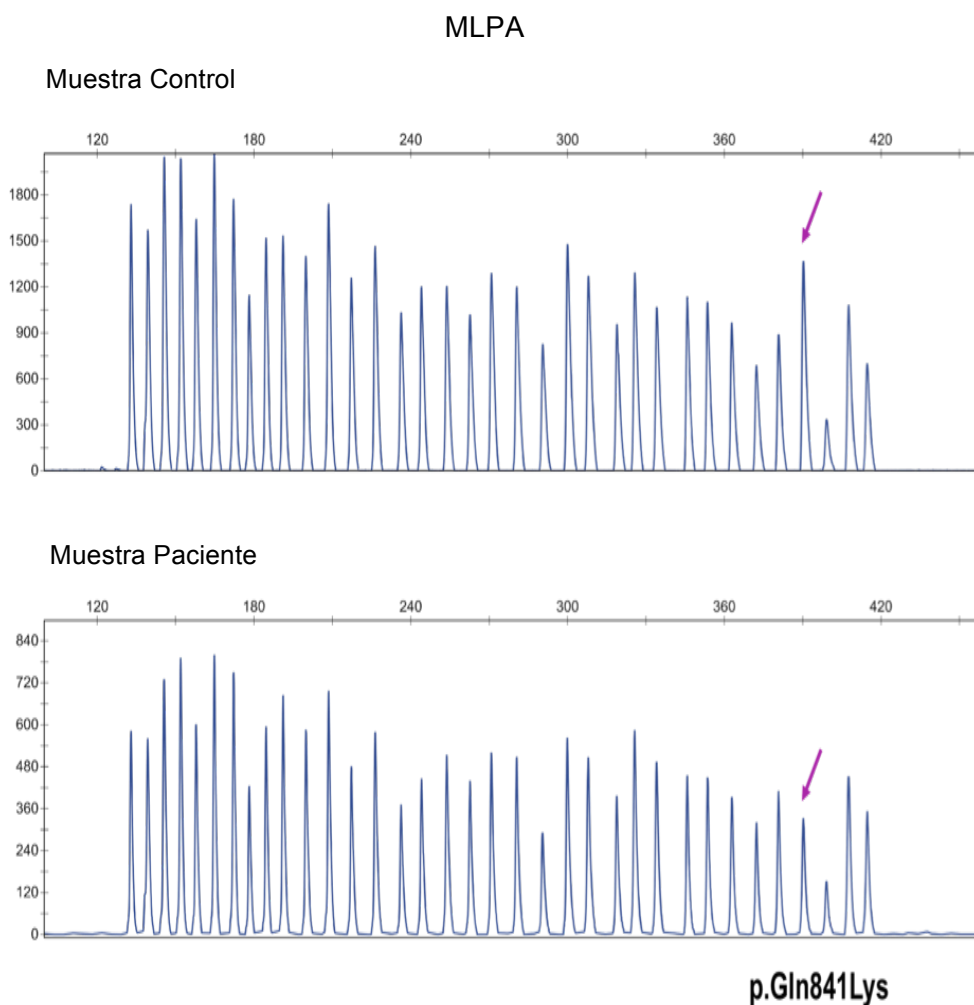


Figura 4.15. Electroferogramas del MLPA realizado en un control sano y en el paciente de la familia ARDM-259. El pico señalado representa la sonda que hibrida con el exon 16 del gen *ABCA4*. En el paciente se observa un pico más bajo, sugiriendo la existencia de una dosis más baja en este fragmento del gen.

A continuación mediante secuenciación automática confirmábamos que se trataba de la mutación no sinónima (p.Gln841Lys) detectada previamente mediante el HRM.

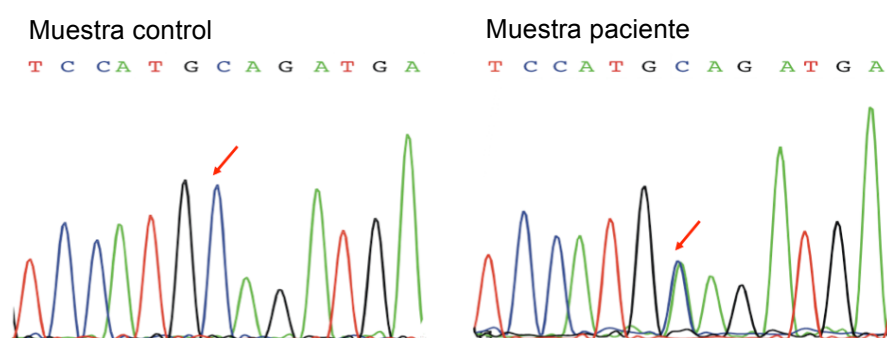


Figura 4.16. Secuencias de la muestra control y de la muestra del paciente del exon 16 donde se detectó la nueva mutación p.Gln841Lys.

En la siguiente tabla resumimos las nuevas mutaciones detectadas, así como su frecuencia alélica tanto en pacientes como en controles y su segregación.

| Familia | Cambio de aminoácido | Frecuencia alélica en pacientes | Frecuencia alélica en controles | Segregación |
|-----------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|
| ARDM-164* | p.Gln234X | 1/420 | N/A | Sí |
| ARDM-135* | p.Asn344fsX | 1/420 | N/A | N/R |
| ARDM-158* | p.Gln1513fsX1525 | 1/420 | N/A | N7R |
| ARDM-181 | IVS38+5G>A | 1/420 | N/A | Sí |
| ARDM-125* | p.KNLFA1876dup | 1/420 | N/A | Sí |
| ARDM-174* | IVS44+2T>A | 1/420 | N/A | Sí |
| ARDM-225 | p.Gln2187X | 1/420 | N/A | Sí |
| ARDM-167* | p.Arg187His | 2/420 | 0/100 | N/R |
| ARDM-257 | p.Arg187His | 2/420 | 0/100 | Sí |
| ARDM-308 | p.Glu531Gly | 1/420 | 0/100 | Sí |
| ARDM-240 | p.Ala762Glu | 1/420 | 0/100 | Sí |
| ARDM-259 | p.Gln841Lys | 1/420 | 0/100 | Sí |
| ARDM-248 | p.Tyr954Ser | 1/420 | 0/100 | Sí |
| ARDM-163* | p.Trp1724Cys | 2/420 | 0/100 | Sí |
| ARDM-197 | p.Trp1724Cys | 2/420 | 0/100 | Sí |
| ARDM-300 | p.Leu1850Pro | 1/420 | 0/100 | N/R |
| RP-532 | p.Ala1773Val | 1/420 | 0/100 | Sí |
| ARDM-146* | p.Ile2047Asn | 1/420 | 0/100 | Sí |
| ARDM-84* | p.Cys2137Tyr | 3/420 | 0/100 | Sí |
| ARDM-247 | p.Cys2137Tyr | 3/420 | 0/100 | Sí |

Tabla 4.22. Frecuencias alélicas de las nuevas mutaciones detectadas en este estudio y su segregación.

N/A: No analizado; Considerados cambios patogénicos.

N/R: No realizado.

A continuación se comparan los alelos mutados identificados mediante las distintas técnicas empleadas, en los diferentes fenotipos:

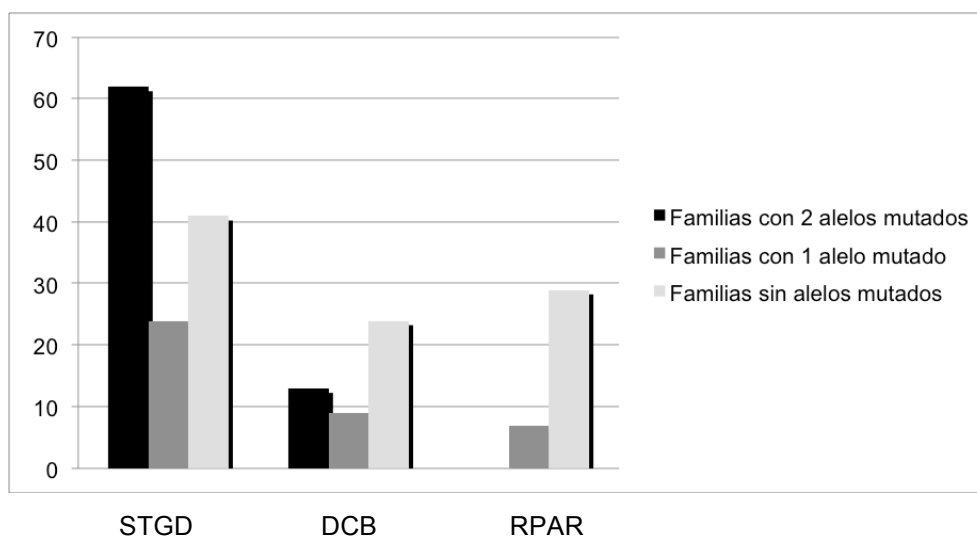


Figura 4.17. Representación gráfica de los distintos fenotipos asociados a mutaciones en el gen *ABCA4* y porcentaje de familias con 2, 1 y ningún alelo mutado en cada uno de ellos.

Se puede observar que la patología en la que se detecta mayor número de familias con 2 alelos mutados es en la STGD, algo menor en la DCB y ninguna en la RPAR.

1.2 ESTUDIO GENÉTICO INDIRECTO

1.2.1 FAMILIAS ESTUDIADAS

El estudio familiar se realizó en 122 de las 210 familias (122/210; 58.1%), como se vera a continuación.

1.2.2 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

Debido al elevado número de familias estudiadas, los resultados se presentan por fenotipos:

a) Enfermedad de Stargardt (STGD)

El análisis de haplotipos se realizó en 82 de las 127 familias con STGD (82/127;64.5%), ya que en 45 de las familias (45/127) únicamente se contaba con el caso índice. En 10 familias estudiadas (10/82) fue posible descartar el gen *ABCA4* como responsable de la enfermedad debido a que en el análisis indirecto realizado se observó que los haplotipos no co-segregaban con la enfermedad. En las 72 familias restantes que mostraban co-segregación, se identificaron alelos mutados en 59 de ellas (59/72).

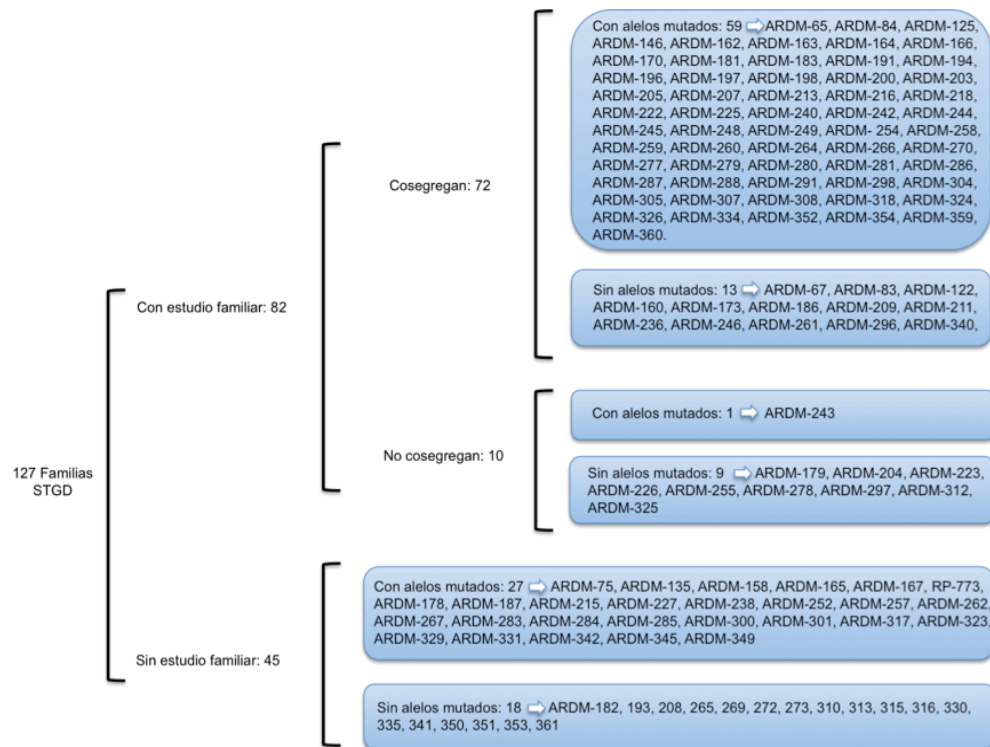
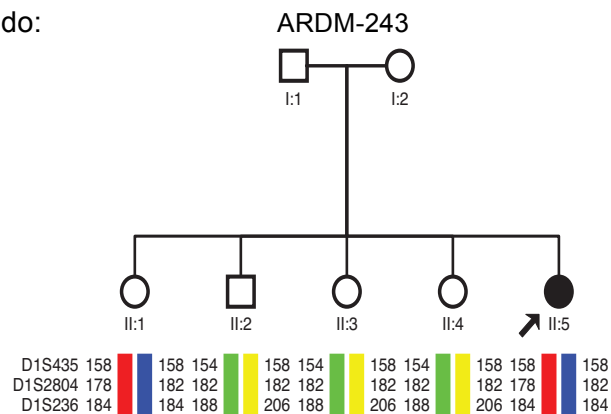


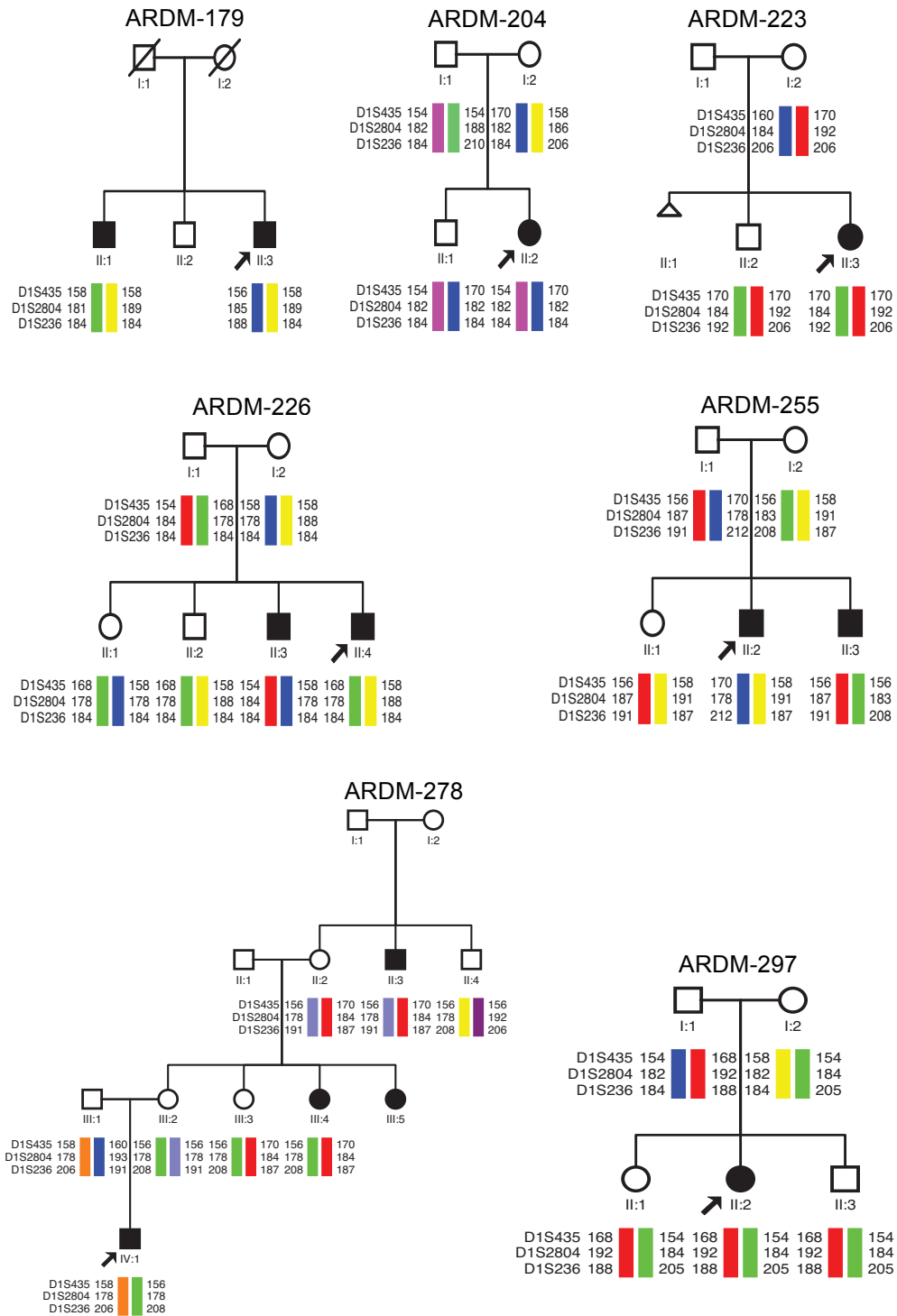
Figura 4.18. Esquema del análisis de haplotipos realizado en las familias con Enfermedad de Stargardt.

A continuación se muestran los árboles genealógicos de aquellas familias en las que el análisis de haplotipos permitió descartar el gen *ABCA4* como responsable de enfermedad:

- Con un alelo mutado:



- Sin alelos mutados:



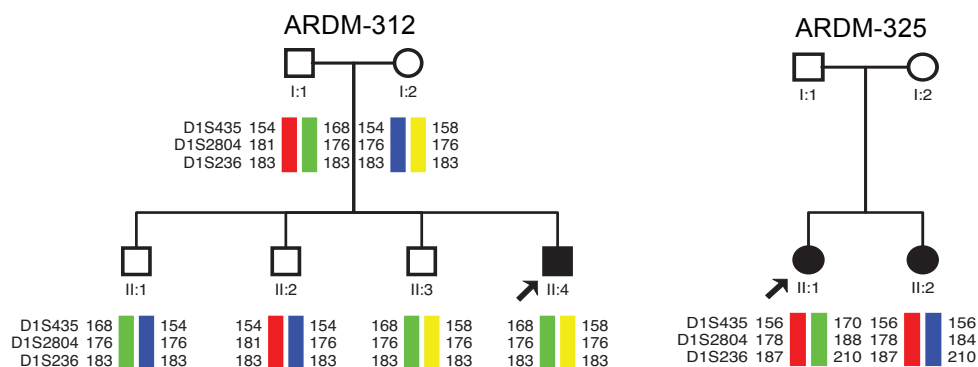


Figura 4.19. Árboles genealógicos de familias con Enfermedad de Stargardt que no co-segregan con la enfermedad.

A continuación se muestran los árboles genealógicos de las familias ARDM-170, ARDM-181 y ARDM-216 en las que se realizó el análisis de haplotipos y se observaron diferentes recombinaciones en la región cromosómica donde se encuentra localizado el gen *ABCA4*.

En la familia ARDM-170 se identificaron los 2 alelos mutados (p.Pro1486Leu y p.Arg408X) en el probandus con STGD (II:1). Este paciente presenta a la edad de 14 años un fondo de ojo con maculopatía en ojo de Buey compatible con enfermedad de Stargardt y una disminución de la agudeza visual de 0.5 en ambos ojos. A continuación se confirmaron dichos alelos en los padres consanguíneos (primos 3º) y hermano mediante secuenciación automática, determinando que el alelo mutado (p.Pro1486Leu) provenía del padre y el alelo mutado (p.Arg408X) de la madre. El hermano (II:2) también presentaba los 2 alelos mutados, sin embargo a diferencia de su hermano 3 años mayor, éste no presentaba síntomas. A continuación se realizó el análisis de haplotipos que mostró que ambos hermanos presentaban una recombinación cromosómica en la región donde se localiza el gen *ABCA4* (Ver tabla 3.12) y que comparten los mismos marcadores microsatélites, como se puede ver en la siguiente figura:

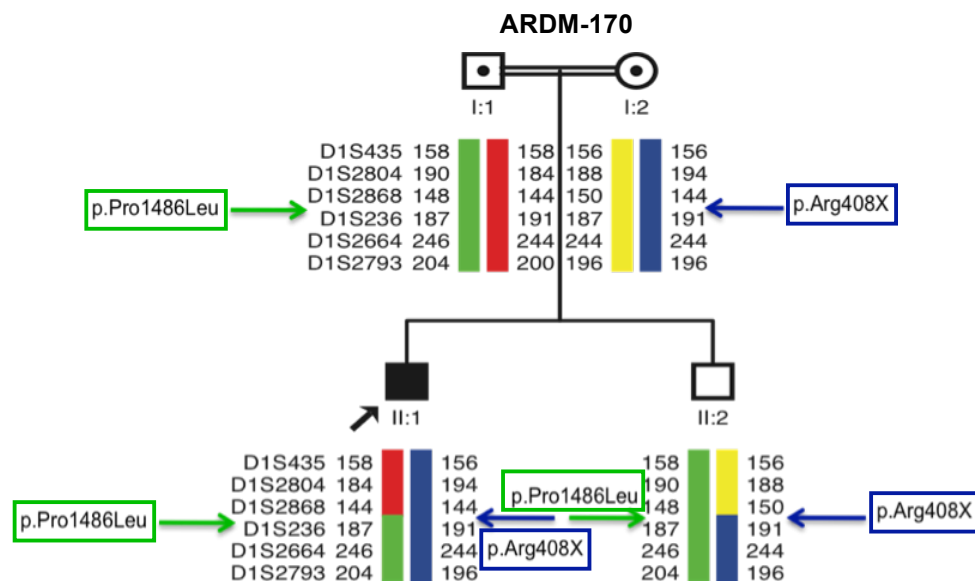


Figura 4.20. Arbol genealógico de la familia ARDM-170 en el que se muestra los haplotipos y las recombinaciones cromosómicas.

En la familia ARDM-181 se identificaron los 2 alelos mutados (p.Arg1108His y IVS38+5G>A) en el probandus (II:4) diagnosticado de STGD mediante la combinación de microarray y dHPLC. A continuación, se confirmaron dichos alelos mutados en el hermano afecto (II:3) mediante secuenciación automática. Sin embargo, el hermano (II:2) solo era portador del alelo mutado (IVS38+5G>A) y la hermana (II:1) no era portadora de ninguno de los alelos mutados que presentaban sus dos hermanos afectados. A continuación se realizó el análisis de haplotipos que mostró una recombinación cromosómica en el probandus (II:4), como se observa en la siguiente figura:

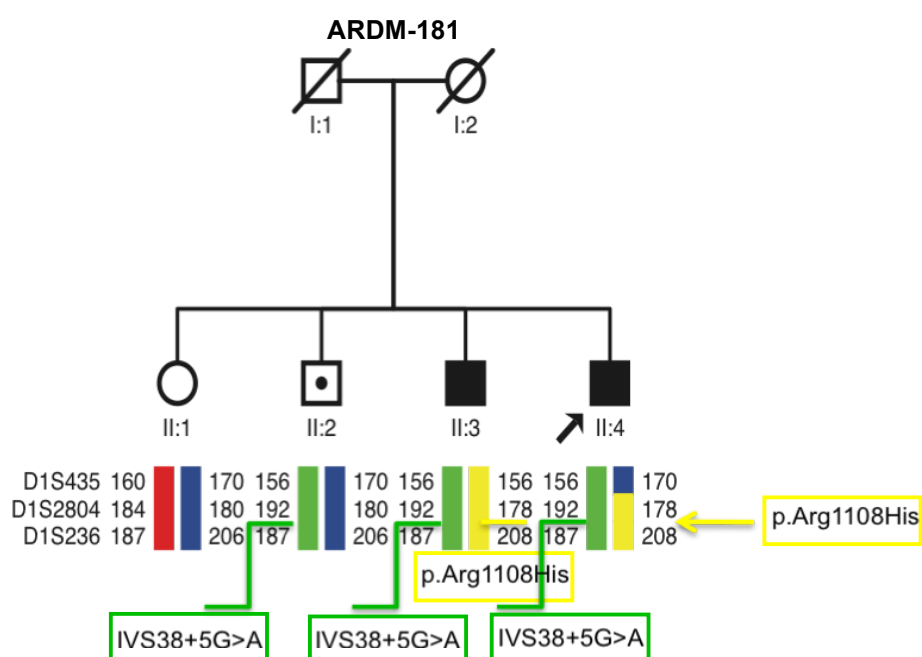


Figura 4.21. Arbol genealógico de la familia ARDM-181 en el que se muestra los haplotipos, la segregación de los alelos mutados y la recombinación cromosómica en el probandus.

En la familia ARDM-216 se identificaron los 2 alelos mutados (p.Thr1526Met y IVS40+5G>A) en el probandus (II:2), mientras que sus dos hermanas eran únicamente portadoras de un alelo mutado diferente. La hermana (II:1) era portadora de la mutación (p.Thr1526Met) proveniente de la madre. Sin embargo, la hermana (II:4) era portadora de la mutación (IVS40+5G>A). A continuación se realizó el análisis de haplotipos, mediante el cual detectamos en la hermana (II:4) una recombinación cromosómica en la región donde se localiza el gen *ABCA4* como se puede ver en la siguiente figura:

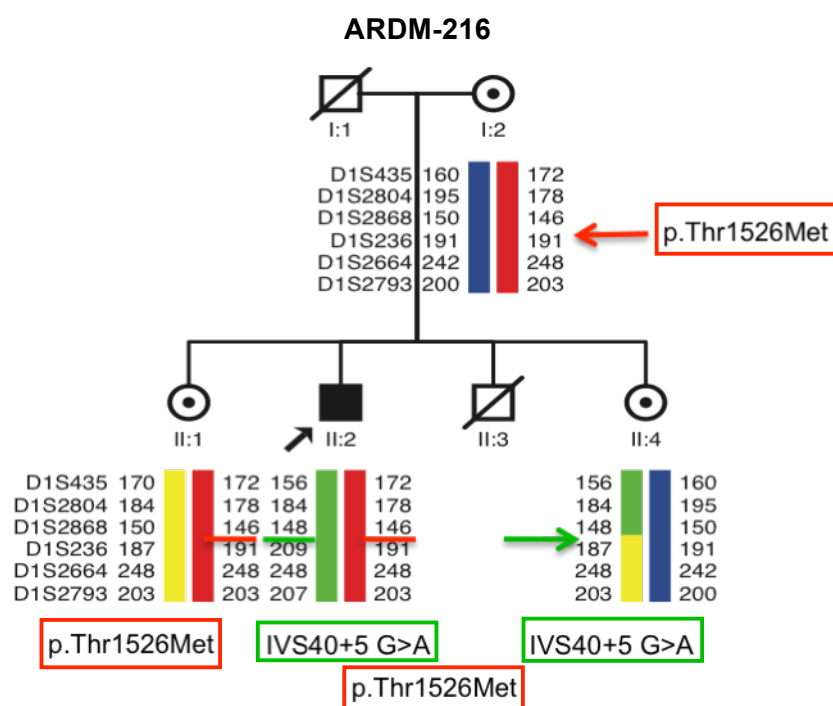


Figura 4.22. Arbol genealógico de la familia ARDM-216 en el que se muestra los haplotipos, la segregación de los alelos mutados y la recombinación cromosómica en la hermana (II:4).

b) Distrofia de conos y bastones (DCB)

El análisis de haplotipos se realizó en 25 de las 46 familias con DCB (25/46; 54.3%), ya que en las otras 21 solo se contaba con el caso índice. En 3 familias estudiadas (3/25) fue posible descartar el gen *ABCA4* como responsable de la enfermedad debido a que en el análisis indirecto realizado se observó que los haplotipos no co-segregaban con la enfermedad. En las 22 familias restantes que mostraban co-segregación, se identificaron alelos mutados en 13 de ellas (13/22).

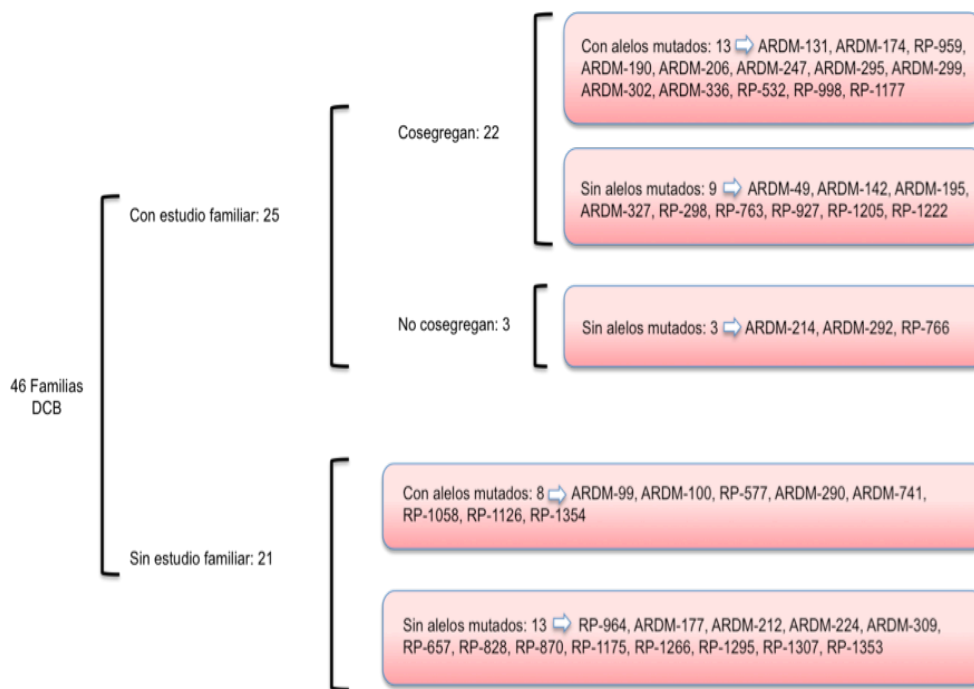


Figura 4.23. Esquema del análisis de haplotipos realizado en las familias con Distrofia de Conos y Bastones.

A continuación se representan los 3 árboles genealógicos en los que se descartó el gen *ABCA4* como responsable de la enfermedad:

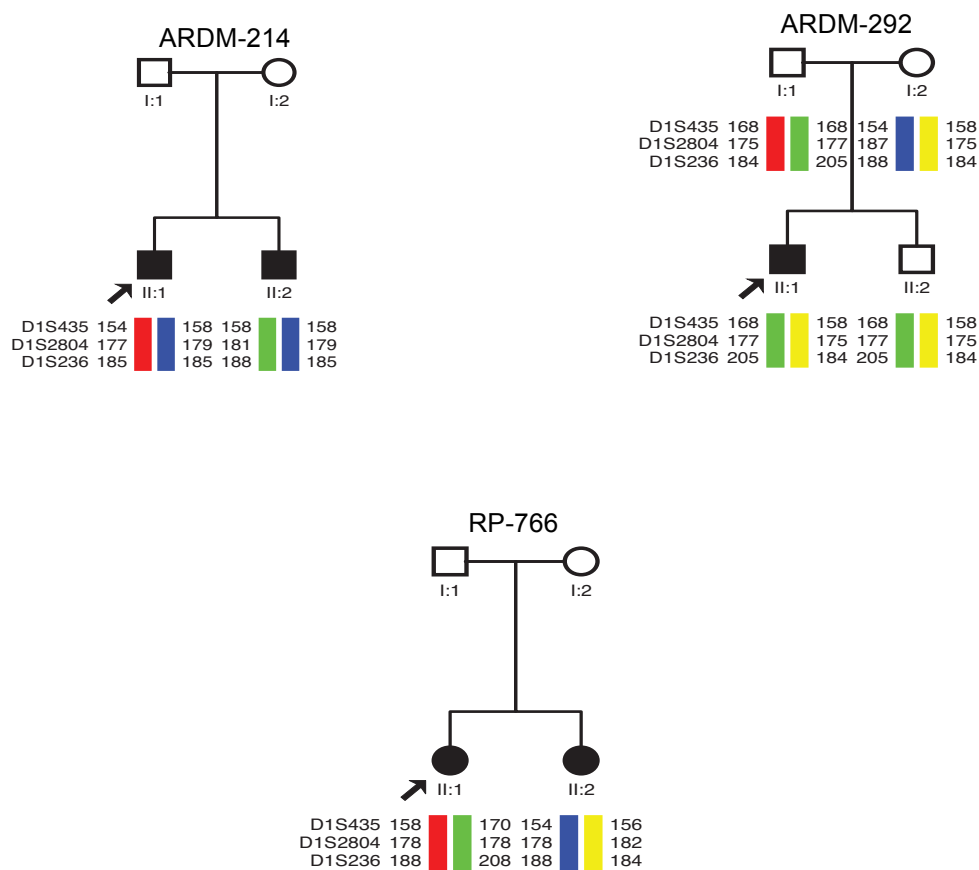


Figura 4.24. Árboles genealógicos de familias con DCB que no co-segregan con la enfermedad.

c) Retinosis Pigmentaria Autosómica Recesiva (RPAR)

El análisis de haplotipos se ha podido realizar en 16 familias de las 36 estudiadas (16/36). En 9 familias estudiadas (9/16) fue posible descartar el gen *ABCA4* como responsable de la enfermedad debido a que en el análisis indirecto realizado se observó que los haplotipos no co-segregaban con la enfermedad. En las 7 familias restantes que mostraban co-segregación, se identificaron alelos mutados en tan solo 1 de ellas (1/7).

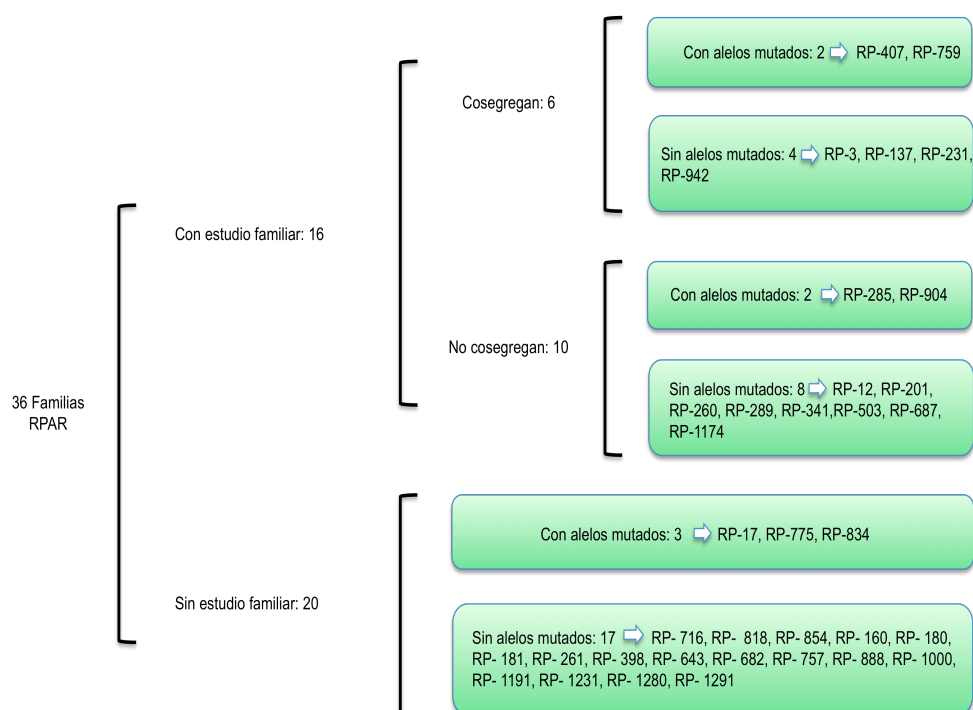
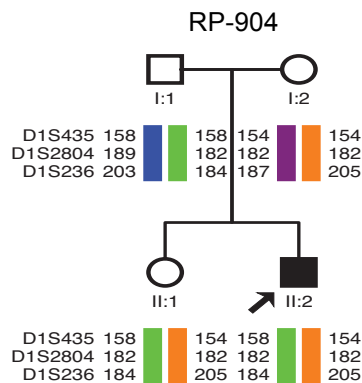
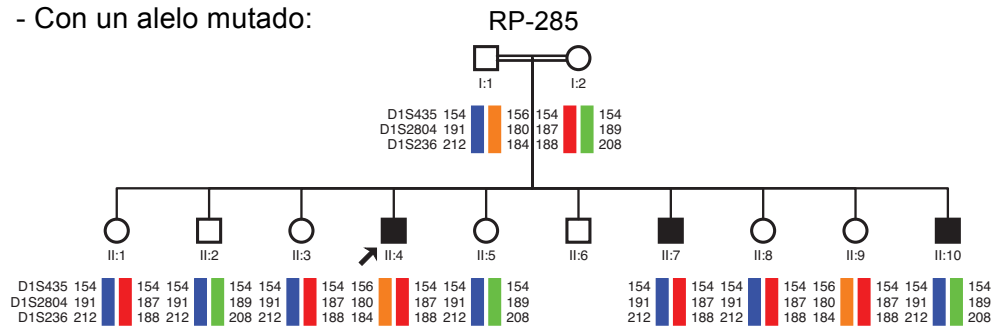


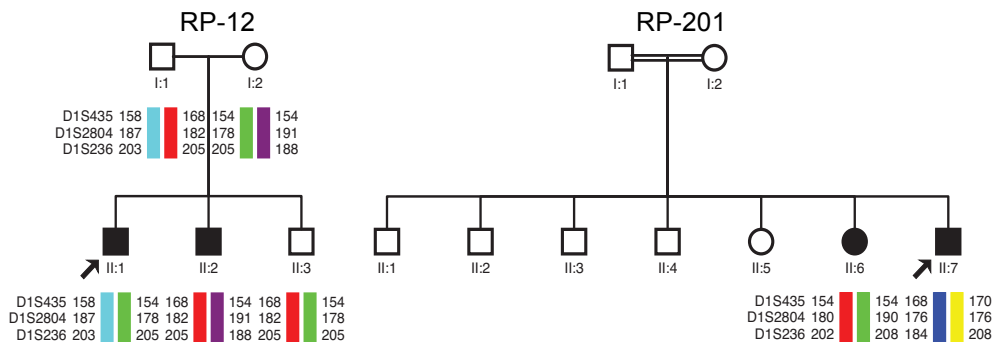
Figura 4.25. Esquema del análisis de haplotipos realizado en las familias con RPAR.

A continuación se muestran los árboles genealógicos de aquellas familias en las que el análisis de haplotipos permitió descartar el gen *ABCA4* como responsable de enfermedad:

- Con un alelo mutado:



- Sin alelos mutados:



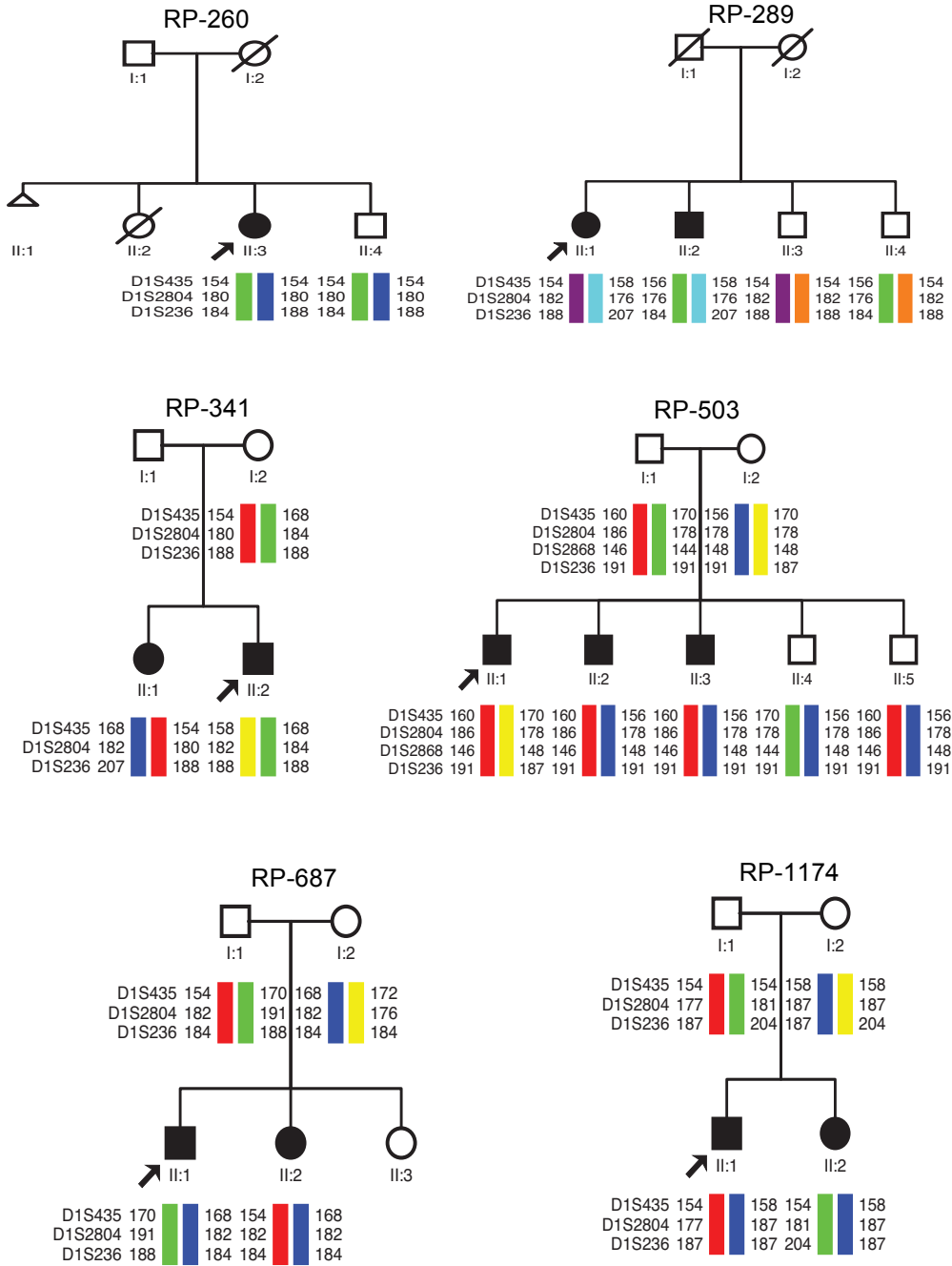


Figura 4.26. Arboles genealógicos de familias con RPAR que no co-segregan con la enfermedad.

1.3 ANÁLISIS DE MARCADORES INTRAGÉNICOS

El propósito de este análisis realizado con marcadores intragénicos (SNPs o polimorfismos de único nucleótido) detectados mediante el microarray de genotipado en 128 pacientes y 84 controles, era determinar:

- 1) asociaciones entre SNPs y mutaciones.
- 2) el papel de los polimorfismos como factores de protección o riesgo.

Los 128 pacientes seleccionados para este estudio presentaban uno o ambos alelos mutados identificados previamente con el microarray de genotipado y confirmados mediante secuenciación automática. Entre los pacientes distinguimos 106/128 (82,8%) diagnosticados de STGD, 15/128 (11,7%) con DCB y 7/128 (5,4%) con RPAR.

Para realizar el estudio, se seleccionaron aquellos alelos mutados que presentaban una frecuencia superior al 5%, estos alelos se muestran en la siguiente tabla:

| Exon | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Genotipo | Pacientes N (%) | Controles N (%) | P |
|------|----------------------|----------------------|------------|--------------------|--------------------|-------|
| 23 | c.3386G>T | p.Arg1129Leu | GG | 94 (73.4) | 84 (100) | 0.000 |
| | | | GT+TT | 34 (26.6) | 0 (0.0) | |
| 42 | c.5882G>A | p.Gly1961Glu | GG | 110 (85.9) | 83 (98.8) | 0.001 |
| | | | GA+AA | 18 (14.1) | 1 (1.2) | |
| 13 | c.1804C>T | p.Arg602Trp | CC | 120 (93.8) | 84 (100) | 0.020 |
| | | | CT+TT | 8 (6.3) | 0 (0.0) | |
| 22 | c.3211insGT | Frameshift | Normal | 121 (94.5) | 84 (100) | 0.029 |
| | | | N/I + I/I* | 7 (5.5) | 0 (0.0) | |
| 45 | c.6179T>G | p.Leu2060Arg | TT | 121 (94.5) | 84 (100) | 0.029 |
| | | | TG+GG | 7 (5.5) | 0 (0.0) | |

Tabla 4.23. Representación de las mutaciones más frecuentes identificadas en nuestros pacientes.

Entre los alelos mutados más prevalentes encontramos 4 cambios no sinónimos (p.Arg1129Leu, p.Gly1961Glu, p.Arg602Trp y p.Leu2060Arg) y una inserción de 2 nucleótidos (c.3211insGT).

Por otro lado, 18 polimorfismos localizados en *cis*, considerados no patogénicos, eran detectados en el grupo de pacientes y controles, 7 de ellos producían cambios a nivel de la proteína, 9 eran mutaciones silenciosas y 3 eran cambios intrónicos que no afectan a la zona de corte y empalme del intrón. Mediante la técnica de HRM y secuenciación directa se determinó que todos los polimorfismos estaban actuando en *cis*. En la siguiente tabla se representan los genotipos y frecuencias observadas de los distintos polimorfismos tanto en el grupo de pacientes como en el de controles:

| Exon | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Genotipo | Pacientes N (%) | Controles N (%) | P |
|------|----------------------|----------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|--------------|
| - | IVS48+21C>T | SPLICE | CC CT+TT | 115 (89.8) 13 (10.2) | 84 (100) 0 (0.0) | 0.003 |
| - | IVS10+5 delG | SPLICE | Normal N/D+D/D* | 92 (71.9) 36 (28.1) | 45 (53.6) 39 (46.4) | 0.006 |
| 40 | c.5603A>T | p.Asn1868Ile | AA AT+TT | 101 (78.9) 27 (21.1) | 75 (89.3) 9 (10.7) | 0.049 |
| 19 | c.2828G>A | p.Arg943Gln | GG GA+AA | 115 (89.8) 13 (10.2) | 81 (96.4) 3 (3.6) | 0.076 |
| 45 | c.6249C>T | p.Ile2083Ile | CC CT+TT | 114 (89.1) 14 (10.9) | 68 (81.0) 16 (19.0) | 0.098 |
| 49 | c.6764G>T | p.Ser2255Ile | GG GT+TT | 115 (89.8) 13 (10.2) | 69 (82.1) 15 (17.9) | 0.105 |
| 10 | c.1268A>G | p.His423Arg | AA AG+GG | 60 (46.9) 68 (53.1) | 30 (35.7) 54 (64.3) | 0.108 |
| 40 | c.5682G>C | p.Leu1894Leu | GG GC+CC | 58 (45.3) 70 (54.7) | 47 (56.0) 37 (44.0) | 0.130 |
| 42 | c.5843CA>TG | p.Pro1948Leu | CA CA/TG+TG/TG | 115 (89.8) 13 (10.2) | 70 (83.3) 14 (16.7) | 0.164 |
| 8 | c.981C>T | p.Pro327Pro | CC CT+TT | 126 (98.4) 2 (1.6) | 84 (100) 0 (0.0) | 0.250 |
| 6 | c.635G>A | p.Arg212His | GG GA+AA | 120 (93.8) 8 (6.3) | 76 (90.5) 8 (9.5) | 0.377 |
| 41 | c.5814A>G | p.Leu1938Leu | AA AG+GG | 88 (68.8) 40 (31.3) | 53 (63.1) 31 (36.9) | 0.394 |
| 44 | c.6069C>T | p.Ile2023Ile | CC CT+TT | 111 (86.7) 17 (13.3) | 70 (83.3) 14 (16.7) | 0.495 |
| - | IVS33+48C>T | SPLICE | CC CT+TT | 19 (14.8) 109 (85.2) | 10 (11.9) 74 (88.1) | 0.542 |
| 28 | c.4203C>A/T | p.Pro1401Pro | CC CA/T+A/TA/T | 118 (92.2) 10 (7.8) | 79 (94.0) 5 (6.0) | 0.605 |

| Exon | Cambio de nucleótido | Cambio de aminoácido | Genotipo | Pacientes N (%) | Controles N (%) | P |
|------|----------------------|----------------------|-------------|------------------------|------------------------|-------|
| 10 | c.1269C>T | p. His423His | CC CT+TT | 120 (93.8) 8 (6.3) | 80 (95.2) 4 (4.8) | 0.647 |
| 42 | c.5844A>G | p.Pro1948Pro | AA AG+GG | 92 (71.9) 36 (28.1) | 61 (72.6) 23 (27.4) | 0.906 |
| 46 | c.6285T>C | p.Asp2095Asp | TT TC+CC | 89 (69.5) 39 (30.5) | 59 (70.2) 25 (29.8) | 0.913 |

Tabla 4.24. Representación de los SNPs detectados en nuestros pacientes.

Cabe destacar que todos los polimorfismos presentan una frecuencia superior al 5% tanto en el grupo de pacientes como en el de controles, excepto 3 de ellos: p.Pro327Pro y IVS48+21C>T que no eran detectados entre los controles y p.Arg943Gln cuya frecuencia era de tan solo 3,6% en el grupo de los controles.

La mayoría de polimorfismos no presentan diferencias significativas entre el grupo de pacientes y controles, excepto los polimorfismos (IVS10+5delG, p.Asn1868Ile y IVS48+21C>T) (Tabla 4.23).

A continuación las mutaciones mas frecuentes fueron comparadas con los 18 polimorfismos localizados en *cis* mediante los test estadísticos de χ^2 o Fisher para determinar asociaciones entre ellos.

Los resultados significativos obtenidos se detallan en la siguiente tabla:

| Polimorfismo | | Mutación | | P | Asociación |
|--------------|---------------|------------|---------------|-------|------------|
| | | GG [N (%)] | GT+TT [N (%)] | | |
| p.His423Arg | Normal | 58 (61.7) | 2 (5.9) | 0.000 | Positiva |
| | N/D + D/D* | 36 (38.3) | 32 (94.1) | | |
| p.Pro1401Pro | CC | 84 (89.4) | 34 (100) | 0.048 | Negativa |
| | CA/T + A/TA/T | 10 (10.6) | 0 (0.0) | | |
| IVS33+48C>T | CC | 19 (20.2) | 0 (0.0) | 0.003 | Positiva |
| | CT+TT | 75 (79.8) | 34 (100) | | |
| p.Asn1868Ile | AA | 70 (74.5) | 31 (91.2) | 0.05 | Negativa |
| | AT+TT | 24 (25.5) | 3 (8.8) | | |
| p.Leu1894Leu | GG | 34 (36.2) | 24 (70.6) | 0.001 | Negativa |
| | GC+CC | 60 (63.8) | 10 (29.4) | | |
| p.Leu1938Leu | AA | 60 (63.8) | 28 (82.4) | 0.053 | Negativa |
| | AG+GG | 34 (36.2) | 6 (17.6) | | |

| | | Mutación | | | |
|--------------|------------|--------------|---------------|--------|------------|
| | | p.Gly1961Glu | | | |
| Polimorfismo | | GG [N (%)] | GA+AA [N (%)] | P | Asociación |
| p.His423Arg | Normal | 47 (42.7) | 63 (57.3) | 0.023 | Negativa |
| | N/D + D/D* | 13 (72.2) | 5 (27.8) | | |
| IVS10+5delG | Normal | 84 (76.4) | 8 (44.4) | 0.005 | Positiva |
| | N/D + D/D* | 26 (23.6) | 10 (55.6) | | |
| p.Asn1868Ile | AA | 83 (75.5) | 18 (100) | 0.013 | Negativa |
| | AT+TT | 27 (24.5) | 0 (0.0) | | |
| p.Leu1894Leu | GG | 58 (52.7) | 0 (0.0) | <0.001 | Positiva |
| | GC+CC | 52 (47.3) | 18 (100) | | |
| p.Leu1938Leu | AA | 86 (78.2) | 2 (11.1) | <0.001 | Positiva |
| | AG+GG | 24 (21.8) | 16 (89.9) | | |
| p.Pro1948Pro | AA | 91 (82.7) | 1 (5.6) | <0.001 | Positiva |
| | AG+GG | 19 (17.3) | 17 (94.4) | | |
| p.Asp2095Asp | TT | 86 (78.2) | 3 (16.7) | <0.001 | Positiva |
| | TC+CC | 24 (21.8) | 15 (83.3) | | |
| IVS48+21C>T | CC | 110 (100) | 5 (27.8) | <0.001 | Positiva |
| | CT+TT | 0 (0.0) | 13 (72.2) | | |

| | | p.Arg602Trp | | | |
|--------------|-------|-------------|---------------|--------|------------|
| | | CC [N (%)] | CT+TT [N (%)] | P | Asociación |
| p.Arg943Gln | GG | 112 (93.3) | 3 (37.5) | <0.001 | Positiva |
| | GA+AA | 8 (6.7) | 5 (62.5) | | |
| p.Leu1938Leu | AA | 80 (66.7) | 8 (100) | 0.05 | Negativa |
| | AG+GG | 40 (33.3) | 0 (0.0) | | |

| | | c.3211insGT | | | |
|--------------|------------|----------------|-------------------|--------|------------|
| | | Normal [N (%)] | N/I + I/I [N (%)] | P | Asociación |
| p.His423Arg | Normal | 60 (49.6) | 0 (0.0) | 0.014 | Positiva |
| | N/D + D/D* | 61 (59.4) | 7 (100) | | |
| p.Asn1868Ile | AA | 101 (83.5) | 0 (0.0) | <0.001 | Positiva |
| | AT+TT | 20 (16.5) | 7 (100) | | |
| p.Leu1894Leu | GG | 58 (47.9) | 0 (0.0) | 0.016 | Positiva |
| | GC+CC | 63 (52.1) | 7 (100) | | |

| | | p.Leu2060Arg | | | |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------|------------|
| | | TT [N (%)] | TG+GG [N (%)] | P | Asociación |
| p.His423Arg | Normal | 54 (44.6) | 6 (85.7) | 0.05 | Negativa |
| | N/D + D/D* | 67 (54.4) | 1 (14.3) | | |
| p.Leu1894Leu | GG | 58 (47.9) | 0 (0.0) | 0.016 | Positiva |
| | GC+CC | 63 (52.1) | 7 (100) | | |
| p.Leu1938Leu | AA | 88 (72.7) | 0 (0.0) | <0.001 | Positiva |
| | AG+GG | 33 (27.3) | 7 (100) | | |
| p.Pro1948Leu | CA | 115 (95.0) | 0 (0.0) | <0.001 | Positiva |
| | CA/TG + TG/TG | 6 (5.0) | 7 (100) | | |

Tabla 4.25. Asociaciones positivas y negativas entre las mutaciones más frecuentes y los SNPs.

Respecto a la mutación más frecuente detectada en nuestros pacientes, los análisis estadísticos demostraron diferencias significativas con los polimorfismos p.His423Arg p.Pro1401Pro, IVS33+48C>T, p.Asn1868Ile, p.Leu1894Leu y p.Leu1938Leu. En concreto, se determinó asociación positiva con 2 de ellos (p.His423Arg y IVS33+48C>T) como se observa en la tabla 4.24, ya que la presencia de estos polimorfismos en los pacientes portadores de la mutación p.Arg1129Leu es muy elevada [94,1% ($P = <0,001$); 100% ($P = 0,003$), respectivamente]. Con respecto al resto de polimorfismos, la asociación determinada era negativa, pues la frecuencia detectada entre los pacientes portadores de la mutación p.Arg1129Leu era menor.

Únicamente para el polimorfismo p.Asn1868Ile existen diferencias significativas entre los pacientes y la población control.

La segunda mutación más prevalente fue p.Gly1961Glu y los análisis estadísticos demostraron que esta mutación estaba en asociación positiva con los siguientes polimorfismos: p.Leu1894Leu en el 100% de los pacientes ($P = <0,001$), p.Pro1948Pro en el 94,4% ($P = <0,001$), p.Asp2095Asp en el 83,3% ($P = <0,001$), IVS48+21C>T en el 72,2% ($P = <0,001$) y IVS10+5delG en el 55,6%. Respecto al polimorfismo IVS48+21C>T, no estaba asociado a otra mutación y tampoco era detectado en los 84 controles (Tabla 4.23). Por el contrario, la frecuencia de los polimorfismos p.His423Arg y p.Asn1868Ile entre los pacientes portadores de la mutación p.Gly1961Glu era menor [27% ($P = 0,023$); 0% ($P = 0,013$), respectivamente], por lo que se determinó una asociación negativa entre ellos y la mutación.

La mutación p.Arg602Trp, la tercera en orden de prevalencia, se encontraba en asociación positiva con el polimorfismo p.Arg943Gln ($P = <0,001$), ya que el 62,5% de los pacientes portadores de la mutación p.Arg602Trp también presentan el polimorfismo. Además, este polimorfismo aparece en mayor proporción en pacientes que en controles ($P = 0,076$) (Tabla 4.23).

La cuarta mutación más frecuente era c.3211insGT, en este caso los análisis estadísticos detectaron varias asociaciones positivas entre esta mutación y los siguientes polimorfismos: p.His423Arg ($P = 0,014$), p.Asn1868Ile ($P = <0,001$) y p.Leu1894Leu ($P = 0,016$) (Tabla 4.24).

Y por último, la quinta mutación más prevalente entre los 128 pacientes estudiados fue p.Leu2060Arg y como se observa en la tabla anterior esta mutación se encuentra asociada a los polimorfismos p.Leu1894Leu, p.Leu1938Leu y p.Pro1948Leu.

En la siguiente figura, se representa en el eje vertical los 128 pacientes en color rojo y los 84 controles en color azul y en el eje horizontal, en rojo representadas las 5 mutaciones más frecuentes y en azul los 18 polimorfismos.

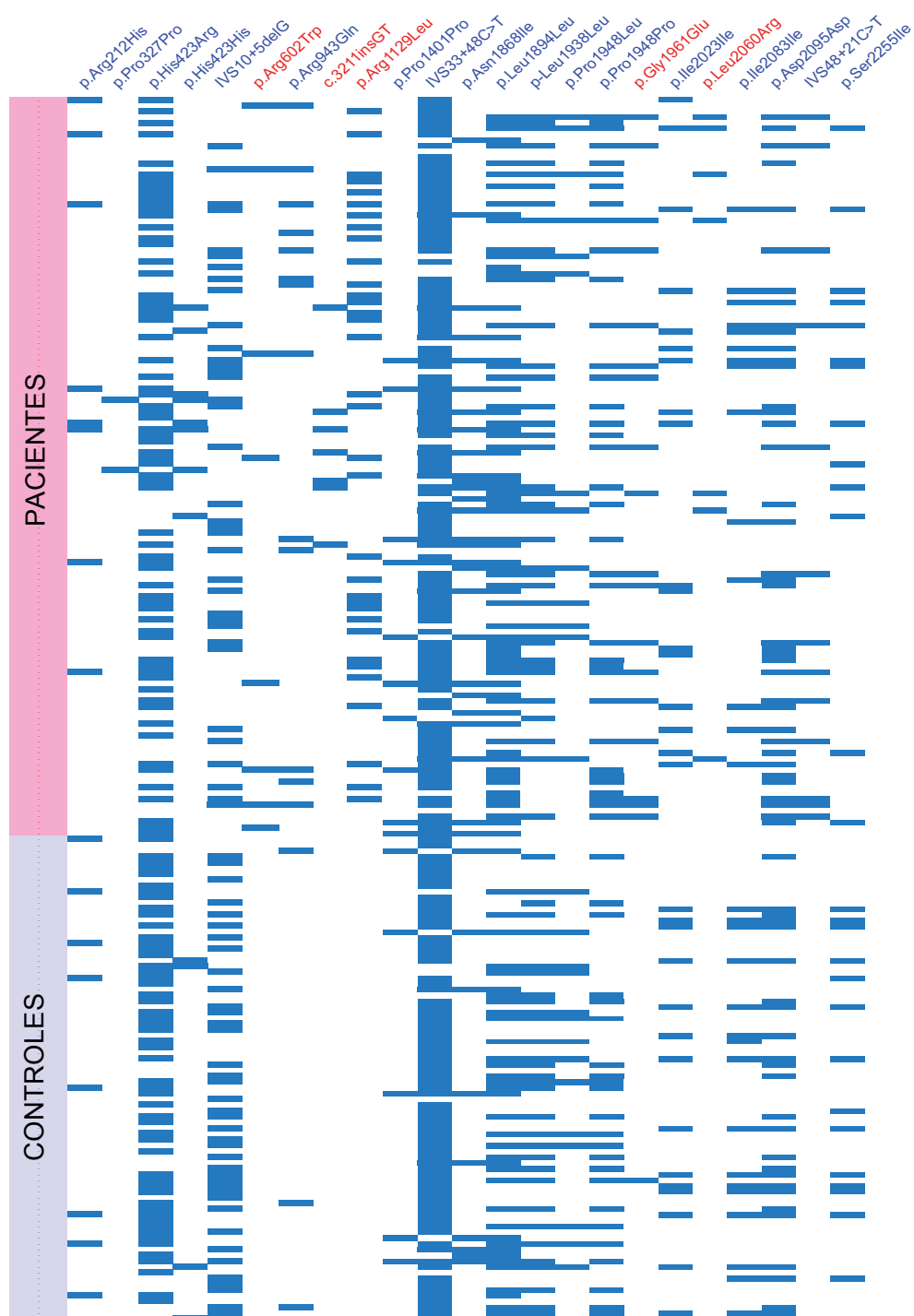


Figura 4.27. Representación de mutaciones y SNPs más frecuentes. Identificación de varias asociaciones entre ellos.

La mayoría de polimorfismos presentan una distribución similar tanto en el grupo de pacientes como en el de controles (Figura 4.27), excepto para los polimorfismos p.Arg943Gln y IVS48+21 C>T, cuyas frecuencias en controles son 3,6% y 0%, respectivamente.

Además, como hemos descrito anteriormente, el polimorfismo p.Arg943Gln se asocia exclusivamente a la mutación p.Arg602Trp y el polimorfismo IVS48+21 C>T se encuentra asociada con la mutación p.Gly1961Glu.

El polimorfismo p.Pro327Pro, se trata de una variante que no produce cambio a nivel de la proteína, considerado como un cambio raro debido a que es muy poco prevalente entre los pacientes (1,56%) y además no se identifica entre los controles.

Por último, hemos obtenido una relación de aquellos polimorfismos que disminuyen o aumentan el riesgo de enfermedad. Estos polimorfismos se representan en la siguiente tabla:

| Polimorfismos | Genotipo | Casos (n =128) | Controles (n = 84) | OR | 95% CI | P-valor |
|---------------|----------|-------------------|-----------------------|----------------|-----------|---------|
| | | N | N | | | |
| p.His423Arg | AA | 60 | 30 | 1 (Referencia) | | |
| | AG+GG | 68 | 54 | 0.46 | 0.25-0.86 | 0.015 |
| IVS10+5delG | Normal | 92 | 45 | 1 (Referencia) | | |
| | N/D+D/D* | 36 | 39 | 0.45 | 0.25-0.80 | 0.007 |
| p.Asn1868Ile | AA | 101 | 75 | 1 (Referencia) | | |
| | AT+TT | 27 | 9 | 2.23 | 1.01-5.01 | 0.05 |

Table 4.26. Representación de los polimorfismos que disminuyen o aumentan el riesgo de enfermedad.

Los portadores de las variantes polimórficas p.His423Arg y IVS10+5delG presentan un menor riesgo de padecer la enfermedad cuando se compara con el homocigoto normal (OR: AG+GG=0.46; 95% CI=0.25-0.86, $P=0.015$ and OR: N/D + DD = 0.45; 95% CI=0.25-0.80, $P=0.007$, respectivamente). Sin embargo, los portadores de la variante p.Asn1868Ile presentan un elevado riesgo de padecer la enfermedad frente a los homocigotos normales (OR: AT+TT= 2.23 95% CI=1.01-5.01, $P=0.05$; Tabla 4.25).

1.4 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Con el fin de determinar si existe una relación entre el inicio y severidad de la enfermedad y las mutaciones identificadas en el gen *ABCA4*, se han agrupado los pacientes en función de la combinación de alelos mutantes más frecuentes encontrados en las familias estudiadas, el fenotipo que presentan y la edad de comienzo de la enfermedad. Los datos empleados en el análisis se muestran en las siguientes tablas:

1- Primeramente, se clasifican los pacientes con el alelo más prevalente p.Arg1129Leu en combinación con otro alelo mutante. El fenotipo asociado a esta combinación de alelos es mayoritariamente STGD y la edad de comienzo oscila desde la primera década de vida hasta la cuarta.

| Familia | Edad de inicio | Fenotipo | Alelo 1 | Alelo 2 |
|----------|----------------|----------|--------------|----------------------------------|
| ARDM-164 | 11 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Gln234X |
| ARDM-200 | 17 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Arg681X |
| ARDM-254 | 13 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Arg152X |
| ARDM-342 | 15 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Arg408X |
| ARDM-281 | 14 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Ser1642Arg p.VVAIC 1681 del |
| ARDM-359 | 12 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Asn380Lys p.Asn1799Asp |
| ARDM-198 | 7 | STGD | p.Arg1129Leu | c.2888delG |
| ARDM-277 | 7 | STGD | p.Arg1129Leu | c.2888delG |
| ARDM-283 | 15 | STGD | p.Arg1129Leu | c.2888delG |
| ARDM-334 | 14 | STGD | p.Arg1129Leu | IVS38-10T>C |
| ARDM-252 | 40 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Arg1129Leu |

| Familia | Edad de inicio | Fenotipo | Alelo 1 | Alelo 2 |
|----------|----------------|----------|--------------|--------------|
| ARDM-317 | 15 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Arg1129Leu |
| ARDM-191 | 18 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Arg602Trp |
| ARDM-345 | 22 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Arg602Trp |
| ARDM-287 | 10 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Thr1019Met |
| ARDM-331 | 37 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Thr1019Met |
| ARDM-227 | 13 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Leu1940Pro |
| ARDM-238 | 17 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Leu1940Pro |
| ARDM-270 | n/d | STGD | p.Arg1129Leu | p.Arg212Cys |
| ARDM-280 | 14 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Gly550Arg |
| ARDM-262 | 19 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Gly607Arg |
| ARDM-244 | 16 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Arg653Cys |
| RP-532 | 24 | DCB | p.Arg1129Leu | p.Ala1773Val |
| ARDM-300 | 16 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Leu1850Pro |
| ARDM-196 | 20 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Met1882Val |
| ARDM-291 | 10 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Leu2060Arg |
| ARDM-247 | 12 | DCB | p.Arg1129Leu | p.Cys2137Tyr |
| ARDM-264 | 14 | STGD | p.Arg1129Leu | p.Cys2150Tyr |

Tabla 4.27. Familias que presentan el alelo mutante más frecuente en población española, su edad de inicio y su fenotipo. n/d: no disponible.

2- En segundo lugar, se muestran aquellos pacientes que poseen el segundo alelo más frecuente: p.Gly1961Glu, en combinación con otro alelo mutante. Asimismo, el fenotipo asociado es STGD y la edad de inicio se sitúa entre la segunda y tercera década de vida.

| Familia | Edad de inicio | Fenotipo | Alelo 1 | Alelo 2 |
|----------|----------------|----------|--------------|-----------------------------|
| ARDM-225 | 23 | STGD | p.Gly1961Glu | p.Gln2187X |
| ARDM-135 | 24 | STGD | p.Gly1961Glu | c.1029_1030insT |
| ARDM-207 | 12 | STGD | p.Gly1961Glu | c.4537insC |
| ARDM-302 | 17 | DCB | p.Gly1961Glu | p.Leu541Pro p.Ala1038Val |
| ARDM-240 | 14 | STGD | p.Gly1961Glu | p.Ala762Glu |
| ARDM-187 | 39 | STGD | p.Gly1961Glu | p.Pro1380Leu |
| ARDM-203 | 13 | STGD | p.Gly1961Glu | p.Arg1640Trp |
| ARDM-266 | 28 | STGD | p.Gly1961Glu | p.Leu2060Arg |
| ARDM-284 | 22 | STGD | p.Gly1961Glu | p.Leu2060Arg |

Tabla 4.28. Familias que presentan el segundo alelo mutante más frecuente, su edad de inicio y su fenotipo.

3- A continuación, se recogen en la siguiente tabla aquellos pacientes que presentan al menos un alelo mutante que produce un codon de parada y por lo tanto una proteína truncada en combinación con una variante que produce un cambio a nivel de la proteína. El fenotipo asociado es STGD y la edad de inicio oscila desde la primera hasta la segunda década:

| Familia | Edad de inicio | Fenotipo | Alelo 1 | Alelo 2 |
|----------|----------------|----------|-----------|--------------|
| ARDM-254 | 13 | STGD | p.Arg152X | p.Arg1129Leu |
| ARDM-164 | 11 | STGD | p.Gln234X | p.Arg1129Leu |
| ARDM-288 | 6 | STGD | p.Glu328X | p.Arg1108Cys |
| ARDM-298 | 4 | STGD | p.Glu328X | p.Gly1977Ser |
| ARDM-342 | 15 | STGD | p.Arg408X | p.Arg1129Leu |
| ARDM-170 | 14 | STGD | p.Arg408X | p.Pro1486Leu |

| Familia | Edad de inicio | Fenotipo | Alelo 1 | Alelo 2 |
|----------|----------------|----------|------------|--------------|
| ARDM-200 | 17 | STGD | p.Arg681X | p.Arg1129Leu |
| RP-998 | 5 | DCB | p.Arg681X | c.3211insGT |
| ARDM-307 | 6 | STGD | p.Tyr1400X | IVS35+2T>C |
| ARDM-336 | 16 | DCB | p.Arg2030X | p.Arg2030X |
| ARDM-225 | 23 | STGD | p.Gln2187X | p.Gly1961Glu |

Tabla 4.29. Familias que portan un alelo mutante que trunca la proteína, su edad de comienzo y su fenotipo.

4- En la siguiente tabla se muestran los pacientes que portan, al menos, un alelo complejo, al igual que el anterior la edad de inicio es entre la primera y segunda década.

| Familia | Edad de inicio | Fenotipo | Alelo 1 | Alelo 2 |
|----------|----------------|----------|----------------------------------|--------------|
| ARDM-359 | 12 | STGD | p.Asn380Lys p.Asn1799Asp | p.Arg1129Leu |
| ARDM-281 | 14 | STGD | p.Ser1642Arg p.VVAIC 1681 del | p.Arg1129Leu |
| ARDM-215 | 12 | STGD | p.Ser1642Arg p.VVAIC 1681 del | p.Cys2150Tyr |
| ARDM-249 | 13 | STGD | p.Ser1642Arg p.VVAIC 1681 del | IVS40+5 G>A |
| ARDM-206 | 8 | DCB | p.Ser1642Arg p.VVAIC 1681 del | IVS39-10 T>C |
| ARDM-302 | 17 | DCB | p.Leu541Pro p.Ala1038Val | p.Gly1961Glu |

Tabla 4.30. Familias que presentan un alelo complejo, su edad de inicio y su fenotipo.

5- En siguiente lugar, se muestran las familias que presentan, al menos, un alelo mutante que produce un cambio en la pauta de lectura. En este grupo el comienzo de la enfermedad es en general temprano, excepto en tres familias donde el segundo alelo no ha sido encontrado por el momento:

| Familia | Edad de inicio | Fenotipo | Alelo 1 | Alelo 2 |
|----------|----------------|----------|-----------------|----------------|
| ARDM-135 | 24 | STGD | c.1029_1030insT | p. Gly1961Glu |
| ARDM-277 | 7 | STGD | c.2888delG | p.Arg1129Leu |
| ARDM-283 | 15 | STGD | c.2888delG | p.Arg1129Leu |
| ARDM-198 | 7 | STGD | c.2888delG | p.Arg1129Leu |
| ARDM-207 | 12 | STGD | c.4537insC | p.Gly1961Glu |
| ARDM-156 | 9 | STGD | c.3211insGT | c.4537delC |
| ARDM-125 | 9 | STGD | c.3211insGT | p.KNLFA1876dup |
| ARDM-178 | 9 | STGD | c.3211insGT | p.Arg2107Pro |
| ARDM-194 | 9 | STGD | c.3211insGT | p.Val931Met |
| ARDM-190 | 8 | DCB | c.3211insGT | p.Asn380Lys |
| RP-998 | 5 | DCB | c.3211insGT | p.Arg681X |
| ARDM-257 | 28 | STGD | c.3211insGT | - |
| ARDM-166 | 30 | STGD | c.3211insGT | - |
| ARDM-167 | 23 | STGD | c.3211insGT | - |
| ARDM-295 | 7 | DCB | c.5917del G | c.5917del G |
| RP-741 | 8 | DCB | c.5917del G | c.5917del G |

Tabla 4.31. Familias con un alelo que produce un cambio en la pauta de lectura, su edad de comienzo y su fenotipo.

6- A continuación, se recogen las familias que presentan un alelo mutante que altera el sitio donador/aceptor del procesamiento de los intrones. Se observa que la edad de inicio es en general entre la primera y segunda década de vida:

| Familia | Edad de inicio | Fenotipo | Alelo 1 | Alelo 2 |
|----------|----------------|----------|-------------|----------------------------------|
| ARDM-308 | 21 | STGD | IVS28+4C>T | p.Glu531Gly |
| ARDM-360 | 9 | STGD | IVS28+4C>T | IVS28+4C>T |
| ARDM-245 | 2 | STGD | IVS28+5G>A | - |
| ARDM-318 | 14 | STGD | IVS28+5G>A | - |
| ARDM-307 | 6 | STGD | IVS35+2T>C | p.Tyr1400X |
| ARDM-181 | 16 | STGD | IVS38+5G>A | p.Arg1108His |
| ARDM-216 | 35 | STGD | IVS40+5G>A | p.Thr1526Met |
| ARDM-260 | 17 | STGD | IVS40+5G>A | p.Arg602Trp |
| ARDM-267 | 18 | STGD | IVS40+5G>A | p.Val931Met |
| ARDM-249 | 13 | STGD | IVS40+5G>A | p.Ser1642Arg p.VVAIC 1681 del |
| ARDM-334 | 14 | STGD | IVS38-10T>C | p.Arg1129Leu |
| ARDM-206 | 8 | DCB | IVS38-10T>C | p.Ser1642Arg p.VVAIC 1681 del |
| ARDM-174 | 4 | DCB | IVS44+2T>A | p.Arg1640Trp |
| RP-1126 | 8 | DCB | IVS26+1G>A | p.Trp2110X |

Tabla 4.32. Familias con un alelo mutante que altera el sitio donador/aceptor, su edad de inicio y su fenotipo.

Por último en la siguiente gráfica se representa el número de familias en las que se han identificado ambos alelos mutados (eje Y) con respecto a la edad de inicio de la enfermedad representada en el eje X:

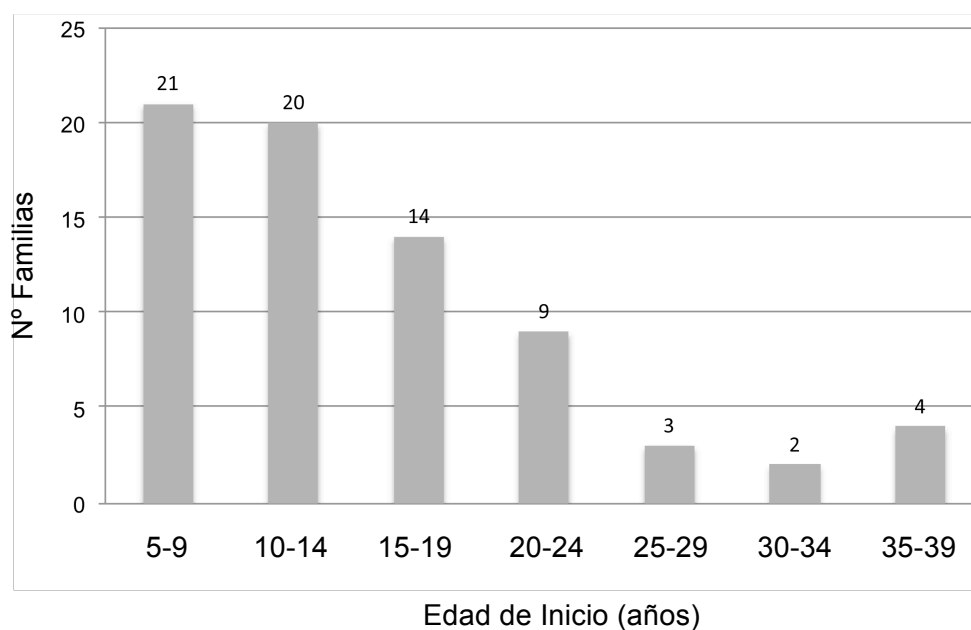


Figura 4.28. Representación gráfica del número de familias frente a la edad de inicio de los síntomas.

Como podemos observar la mayoría de familias (75%) manifiestan los primeros síntomas de enfermedad entre las 2 primeras décadas de vida como era de esperar.

V. Discusión

V. DISCUSIÓN

1- DISCUSIÓN GENERAL

Las distrofias hereditarias de la retina son un conjunto de enfermedades degenerativas y generalmente progresivas, causadas por la afectación primaria de los fotorreceptores. Se caracterizan por su carácter hereditario, la evolución progresiva y por no tener, por el momento, un tratamiento ni paliativo ni curativo (Rivolta C *et al.* 2002).

En los últimos años se ha producido un aumento espectacular del conocimiento acerca de la fisiopatología de las distrofias de retina (DR), habiéndose localizado 197 genes, de los cuales 150 han sido identificados por el momento (RetNet, 13 de Julio de 2009), cuyas mutaciones pueden producir distintas formas clínicas y hereditarias de DR, comprobándose que estas enfermedades son excepcionalmente heterogéneas.

En el caso de la Enfermedad de Stargardt, la mayoría de casos se deben a mutaciones en el gen *ABCA4*. Una minoría de casos de RPAR (0,43%) y algo más de DCB (0,71%) están causados por mutaciones en este gen (Ayuso C *et al.*, Memoria Red EsRetNet 2005; comunicación personal).

Hasta el momento se han descrito en el gen *ABCA4* aproximadamente 500 cambios entre mutaciones potencialmente asociadas a enfermedad y polimorfismos de único nucleótido (*SNP*), considerándose uno de los genes más polimórficos.

Pese a los grandes logros conseguidos en el campo de la genética y la oftalmología, todavía existe un número elevado de personas que padecen estos graves defectos visuales y para los que no existe aún un tratamiento eficaz.

Recientemente se han alcanzado importantes avances en terapia génica, convirtiéndose en una de las principales opciones terapéuticas, pero la aplicación de esta terapia requiere primeramente conocer la mutación o mutaciones que producen la enfermedad.

Dado que es necesario conocer el espectro completo de estos cambios, esta investigación pretende, por un lado, determinar el mejor abordaje molecular para este tipo de DR y, por otro lado, realizar una caracterización genotípica y fenotípica, ya que resulta esencial para el diagnóstico de estas enfermedades, facilitando a los pacientes un asesoramiento genético adecuado.

2- GEN ABCA4

2.1- ESTUDIO GENÉTICO DIRECTO. COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS

El estudio genético directo del gen *ABCA4* se realizó mediante el empleo de distintas tecnologías de cribado mutacional con el fin de valorar cual de ellas era más eficiente y eficaz.

2.1.1- MICROARRAY DE GENOTIPADO

El primer cribado mutacional que se efectuó en nuestros pacientes fue el microarray de genotipado ABCR400 diseñado por Asperbio (Jaakson K *et al.*, 2003).

En la siguiente tabla comparamos las tasas de detección en nuestra población así como en otras:

| Diagnóstico | Nº Familias | Alelos mutados | Familias mutadas | Población |
|-------------|-------------|-----------------|------------------|--|
| STGD | 136 | 54-60% | - | USA (Jaakson K <i>et al.</i> , 2003) |
| STGD | 110 | 120/220 (54,5%) | 72/110 (65,4%) | España (Este trabajo) |
| DCB | 54 | 29/108 (26,8%) | 18/54 (33%) | Países Bajos (Klevering BJ <i>et al.</i> , 2004) |
| DCB | 36 | 26/72 (36,1%) | 16/36 (44,4%) | España (Este trabajo) |
| RPAR | 29 | 9/58 (15,5%) | 7/29 (24%) | USA (Wiszniewski W <i>et al.</i> , 2005) |
| RPAR | 90 | 6/180 (3,4%) | 5/90 (5,6%) | Países Bajos (Klevering BJ <i>et al.</i> , 2004) |
| RPAR | 31 | 5/62 (8,1%) | 5/31 (16,1%) | España (Este trabajo) |

Tabla 5.1. Comparación de las tasas de detección del microarray de genotipado en distintas poblaciones.

2.1.1.1- APLICACIÓN DEL MICROARRAY DE GENOTIPADO EN LA ENFERMEDAD DE STARGARDT

Mediante esta técnica se estudiaron un total de 110 nuevas familias de STGD. Se identificaron 120 alelos mutados asociados a enfermedad, lo que supone una tasa de detección de 54,5%. Este porcentaje es similar al identificado por Jaakson K *et al.*, ya que en sus series de pacientes el microarray detecta entre el 54-60% de los alelos asociados a enfermedad (Tabla 5.1).

A diferencia de otras poblaciones europeas, la mutación mas frecuente en nuestros pacientes es p.Arg1129Leu, que representa el 21,6% de los alelos asociados a enfermedad, porcentaje similar a anteriores estudios de población española (Valverde D *et al.*, 2006, Valverde D *et al.*, 2007). En contraste, la frecuencia de este cambio en población norteamericana es menor del 1%, con un solo caso previo (Webster AR *et al.*, 2001) y ni siquiera ha sido detectada en población portuguesa (Maia-Lopes *et al.*, 2009), sugiriendo que la población española es genéticamente diferente a otras poblaciones europeas, incluso la portuguesa.

La variante más frecuente en otras poblaciones europeas es p.Gly1961Glu (Jaakson K *et al.*, 2003), que en población española es la segunda mutación más prevalente, representando el 5,4% de los alelos asociados a enfermedad. Este porcentaje es similar a la frecuencia encontrada en población danesa (5,8%), sin embargo es bastante menor al de otras poblaciones europeas donde se ha observado un rango de frecuencias comprendido entre 10% y 21% (Jaakson K *et al.*, 2003, Rivera A *et al.*, 2000, Fumagalli A *et al.*, 2001,). Sin embargo, en población

portuguesa es algo menor (Maia-Lopes S *et al.*, 2009), siendo también la segunda mutación más prevalente como sucede en población española.

| Alelo mutante | Población STGD | Frecuencia entre alelos mutados (%) | Referencia |
|---------------|----------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| p.Gly1961Glu | Eslovenia | 21,4% | Jaakson K <i>et al.</i> , 2003 |
| | Italia | 12,9% | Jaakson K <i>et al.</i> , 2003 |
| | Alemania | 12% | Rivera A <i>et al.</i> , 2000 |
| | Países Bajos | 11% | Jaakson K <i>et al.</i> , 2003 |
| | Italia | 10% | Fumagalli A <i>et al.</i> , 2001 |
| | Portugal | 9,5% | Maia-Lopes S <i>et al.</i> , 2009 |
| | Dinamarca | 5,8% | Rosenberg T <i>et al.</i> , 2007 |
| | España | 5,4% | Este trabajo |

Tabla 5.2. Las distintas frecuencias de la mutación más prevalente en *ABCA4* en pacientes STGD europeos. A diferencia de población española que se trata de la segunda más frecuente.

La tercera mutación más frecuente es p.Arg602Trp, representando el 3,4% de los alelos asociados a enfermedad. Esta mutación fue descrita por primera vez en población europea por Papaioannou M *et al.* en el año 2000. Fue observada en un único paciente. La prevalencia encontrada en este estudio era algo inferior a la observada en nuestro estudio (1,42%), al igual que sucedía en otras poblaciones (Lewis RA *et al.*, 1999, Webster AR *et al.*, 2001) en los cuales la prevalencia era del orden de 0,36 y <0,01, respectivamente.

Estas 3 mutaciones junto con las siguientes más frecuentes (c.3211insGT y p.Leu1940Pro) constituyen tan solo el 30,4% de los alelos identificados en el gen *ABCA4* en población española, por lo que se demuestra la existencia de una alta heterogeneidad alélica.

A continuación, se evalúa la validez analítica (**sensibilidad y especificidad**) del microarray de genotipado, de modo que confirmamos las mutaciones encontradas por secuenciación automática identificando 2 falsos positivos y 2 falsos negativos en familias STGD, que determinan una sensibilidad de 98,6% y una especificidad de 99,0%. Valores muy altos que hacen del microarray de genotipado una herramienta fundamental para la detección de mutaciones ya descritas.

2.1.1.2- APLICACIÓN DEL MICROARRAY DE GENOTIPADO EN LA DISTROFIA DE CONOS Y BASTONES AUTOSÓMICA RECESIVA

Mediante el microarray de genotipado, se han estudiado un total de 36 nuevas familias, en 10 de ellas se han identificado ambos alelos mutados (10/36; 27,8%) y en 6 familias se ha encontrado un alelo mutado (6/36;16,7%), de manera que se han detectado un total de 26 alelos mutados en 16 de 36 (44,5%) familias. Este porcentaje de detección es superior que el 33% descrito por Klevering BJ *et al.* en 2004 (Tabla 5.1).

El 46% de los alelos mutados detectados en los pacientes con DCB eran interpretados como “graves”, ya que se trata de cambios nulos que producen un condón de parada prematuro creando una proteína trunca. De manera que, nuestros datos revelan que se cumple la relación inversamente proporcional existente entre la severidad de la mutación y la actividad residual de la proteína RmP propuesta por los investigadores (Maugeri *et al.*, 1999).

En este grupo de pacientes no identificamos ni falsos positivos ni falsos negativos.

2.1.1.3- APLICACIÓN DEL MICROARRAY DE GENOTIPADO EN LA RETINOSIS PIGMENTARIA AUTOSÓMICA RECESIVA

En las 31 familias con RPAR estudiadas mediante el microarray de genotipado, se identificaron un total de 5 alelos mutados en 5 de 31 (16,1%) familias analizadas. Esta tasa de detección es más elevada que el 5,5% descrito por Klevering BJ *et al.*, 2004, pero menor que el 24% descrito por Wiszniewski W *et al.*, 2005 (Tabla 5.1).

Entre los alelos mutados identificados no había ninguno considerado “grave”, por lo que nos cuestionamos la implicación del gen *ABCA4* en la RPAR en población española.

Un total de 177 familias fueron analizadas mediante el microarray de genotipado, entre las cuales se han identificado ambos alelos mutados en 58 (58/177; 32,7%), un alelo mutado en 35 (35/177; 19,7%) y no se identificaron mutaciones en las restantes 84 familias (84/177; 47,4%). Mediante la técnica de microarray de genotipado se identificaron 151 alelos mutados de los 354 totales (42,6%).

Respecto a las 110 familias diagnosticadas de STGD, 72 (65,4%) de ellas eran familias mutadas (48 con dos alelos mutados y 24 con un solo alelo mutado). En las 36 familias con DCB, 16 (44,4%) de ellas eran familias mutadas (10 con dos alelos mutados y 6 con un solo alelo mutado) y con respecto a las 31 familias con RPAR, solamente el 16,1% de las familias estaban mutadas.

| Diagnóstico | Nº Fam | mt/mt | mt/wt | wt/wt | Alelos mutados | Familias Mutadas |
|--------------|------------|-------|-------|-------|-----------------|------------------|
| STGD | 110 | 48 | 24 | 38 | 120/220 (54,5%) | 72/110 (65,4%) |
| DCB | 36 | 10 | 6 | 20 | 26/72 (36,1%) | 16/36 (44,4%) |
| RPAR | 31 | 0 | 5 | 26 | 5/62 (8,1%) | 5/31 (16,1%) |
| TOTAL | 177 | 58 | 35 | 84 | 151/354(42,6%) | 93/177 (52,5%) |

Tabla 5.2. Las respectivas frecuencias de los alelos mutados y de las familias mutadas.

Estos valores nos indican que no es posible identificar ningún alelo mutado asociado a enfermedad en el 34,5% de las familias con STGD, en el 55,5% de familias DCB y en el 83,8% de las familias con RPAR.

Debido al importante número de alelos mutados sin identificar se emplearon distintas técnicas de cribado con la finalidad, por un lado, de identificar nuevas mutaciones no descritas anteriormente en población española y, por otro lado, determinar cuál de las técnicas empleadas es más eficaz y eficiente para el diagnóstico de nuestros pacientes.

2.1.2- APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE dHPLC

Este análisis se llevó a cabo en 55 familias, 35 de las cuales eran diagnosticadas de STGD, 15 de DCB y 5 de RPAR. Las 55 familias fueron previamente analizadas mediante el microarray de genotipado, en 34 pacientes se detectó un alelo mutado asociado a enfermedad, y en el resto de pacientes ninguna mutación fue identificada.

El dHPLC permitió la identificación de 12 mutaciones nuevas, otras 2 mutaciones previamente descritas, no incluidas en el array en el momento del análisis y un falso negativo.

Otros cambios interpretados como no patogénicos fueron también identificados. Entre ellos, un nuevo cambio en el exón 12 (p.Val552Ile) que fue encontrado en la familia ARDM-100 diagnosticada de DCB. En este caso, futuros estudios funcionales son esenciales para determinar la relativa severidad de este cambio. Estos estudios aclararan si este u otros cambios son patogénicos o no, como se sugirió para otras mutaciones como p.Gly1961Glu (Souied EH *et al.*, 1999; Mata NL *et al.*, 2001; Wiszniewski *et al.* 2005).

La tasa de detección combinando las dos metodologías aumenta con respecto al análisis únicamente del microarray. El empleo de estas dos técnicas nos permitió la identificación de ambos alelos mutados asociados a enfermedad en 11 de 55 familias (20,0%).

2.1.3- APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE HRM

Recientemente se ha propuesto una nueva herramienta para la detección de variaciones en la secuencia de ADN. Se trata de la técnica de HRM, que se caracteriza por el empleo de una nueva química intercalante que tiene la peculiaridad de ser saturante.

Mediante esta técnica se estudiaron las mismas 55 familias que fueron estudiadas con la técnica de dHPLC, con el fin de comparar ambas metodologías y determinar cuál de ellas es más eficaz para el estudio del gen *ABCA4* en los pacientes con STGD, DCB y RPAR.

Todas las alteraciones encontradas con el dHPLC, excepto c.1029_1030insT, fueron detectadas mediante HRM. Esta mutación se localiza en el exón 8, que constituye un fragmento de 400 pb. En estudios anteriores se ha observado que la identificación de errores se producía en fragmentos de 400 pares de bases (pb) o superior, sugiriendo una clara dependencia con el tamaño del fragmento amplificado (Gudrun HR *et al.*, 2004).

Por el contrario, a diferencia del dHPLC, el HRM detectó un cambio (p.Arg187His) en el exón 5 que no había sido descrito anteriormente. En este caso el producto amplificado poseía un tamaño de 220 pb y la curva de *melting* mostraba 2 dominios. Recientemente se ha observado que en fragmentos que presentan varios dominios de *melting* se disminuye la detección de variantes en dicho fragmento (Vossen R. *et al.*, 2009), sin embargo, esto no sucede en el fragmento del exón 5 donde se observa una diferencia en el patrón de las curvas de *melting* entre la muestra control y la muestra mutada incluso en ambos dominios.

La mutación p.Trp1724Cys fue identificada en 2 pacientes con STGD. El HRM fue capaz de localizar la variante en ambos pacientes, a diferencia del dHPLC que solo la detectó en un paciente.

Con respecto a las mutaciones en homocigosis, la técnica de dHPLC no es capaz de discriminar este tipo de alteraciones, a no ser que se mezcle previamente con una muestra control en una proporción 1:1. Sin embargo, la técnica de HRM fue capaz de identificar una mutación en homocigosis en la familia ARDM-84.

En nuestro estudio no se identificaron falsos positivos, en consecuencia, tanto la especificidad del dHPLC como la del HRM fue del 100%. No obstante, la sensibilidad de ambas tecnologías no fue del 100%, ya que se determinaron varios falsos negativos. Así la sensibilidad del HRM fue del 95% y la del dHPLC fue tan solo del 80%.

Por los resultados hallados se decidió estudiar a un grupo de 14 pacientes únicamente con la técnica de HRM detectando un total de 4 nuevas mutaciones.

Nuestros resultados establecen que el HRM posee mayor poder de resolución y es más efectivo que el dHPLC, por lo que el HRM es considerado un instrumento de mayor utilidad para la detección de nuevas mutaciones en el gen *ABCA4*.

2.1.4- APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MLPA

La técnica de MLPA se diseñó principalmente para detectar deleciones o duplicaciones de gran tamaño, incluso de uno o más exones.

Mediante esta técnica se estudiaron un total de 50 familias. Los resultados obtenidos permitieron descartar posibles deleciones o duplicaciones en la región cromosómica donde se encuentra el gen *ABCA4* que pudiesen representar uno de los alelos responsables de la enfermedad. Por lo que este tipo de mutaciones no son una causa frecuente de estas retinopatías.

Sin embargo, esta técnica nos permite detectar mutaciones puntuales como sucedió en la familia ARDM-259, en la cual se detectó una nueva variante mediante el HRM y se confirmó mediante el MLPA.

En conclusión, el microarray de genotipado es una herramienta fundamental para la búsqueda de mutaciones ya descritas en nuestros pacientes con patología retiniana asociada al gen *ABCA4*. Gracias a la cual, en nuestro grupo de pacientes se han identificado un número elevado de alelos *ABCA4* asociados a enfermedad. Por otra parte, mediante el empleo de las técnicas de dHPLC y HRM, herramientas empleadas para la búsqueda de nuevas mutaciones, conseguimos detectar 16 nuevas mutaciones no identificadas en 100 cromosomas controles, otras 2 mutaciones previamente descritas, no incluidas en el array en el momento del análisis y un falso negativo. De manera que se consiguió el diagnóstico completo en un total de 15 familias. La última técnica empleada fue el MLPA, para detectar duplicaciones o deleciones de material genético. En nuestros pacientes no se detectaron grandes reestructuraciones (duplicaciones/deleciones), por lo que no son una causa frecuente de la enfermedad como ya se dedujo en otros estudios previos (Yatsenko AN *et al.*, 2003).

La estrategia llevada a cabo en este trabajo representa la óptima identificación de alelos mutados en pacientes españoles con fenotipos asociados a *ABCA4*.

Además las nuevas mutaciones identificadas podrían ser incluidas en el array, incrementando, de esta manera, la detección y validez del chip de genotipado.

2.2- ESTUDIO GENÉTICO INDIRECTO

La finalidad de este análisis es la obtención de haplotipos en las familias estudiadas para averiguar si cosegregan o no con la enfermedad.

2.2.1- ENFERMEDAD DE STARGARDT

El estudio familiar se realizó en 82 familias con STGD. En 72 de ellas el análisis permitió determinar que los haplotipos siempre cosegregaban con la enfermedad. En el resto de familias se pudo excluir *ABCA4* como gen responsable. En 1 de las 10 familias descartadas se identificó un alelo mutado. Este hecho sugiere que probablemente exista un elevado número de portadores sanos en nuestra población (Riveiro-Alvarez R *et al.*, 2008).

En 45 familias con STGD contábamos únicamente con el caso índice por lo que no fue posible llevar a cabo el análisis de haplotipos. En 27 de las 45 familias se identificó al menos un alelo mutado por lo que sería conveniente realizar el estudio familiar para determinar la segregación con la enfermedad. En aquellas familias en las que se han identificado ambos alelos mutados sería también adecuado efectuar el estudio familiar para determinar que no se trate de un alelo doble mutado. Como sucedió en la familia ARDM-257 diagnosticada de STGD, en la cual el análisis de haplotipos determinó que las 2 mutaciones detectadas en el paciente se encontraban en el mismo alelo, localizándose en *cis*, dando lugar a un alelo doble mutado. En la familia ARDM-167, también diagnosticada de STGD, se detectaron las mismas mutaciones que en la familia ARDM-257, por lo que es muy probable que se trate de un doble alelo mutado. Aunque, en este caso, este hecho no se ha podido confirmar ya que solo contábamos con el caso índice.

2.2.2- DISTROFIA DE CONOS Y BASTONES AUTOSÓMICA RECESIVA

El análisis de haplotipos realizado en familias con DCB permitió excluir el gen *ABCA4* como responsable de enfermedad en 3 de 25, sugiriendo la existencia de otro gen responsable. En estas familias excluidas no se identificaron alelos mutados, lo que descarta que alteraciones en este gen puedan ejercer algún efecto modulador o regulador sobre el fenotipo del paciente, sugiriendo la existencia de otros genes responsables.

En las 22 familias restantes el análisis permitió determinar que los haplotipos cosegregaban con la enfermedad.

En aquellas familias en las que solo contábamos con el caso índice sería conveniente la recepción de muestras de los familiares para efectuar el estudio y determinar si las variantes detectadas en el gen *ABCA4* son realmente la causa de la enfermedad.

2.2.3- RETINOSIS PIGMENTARIA AUTOSÓMICA RECESIVA

El análisis de haplotipos se llevó a cabo en 16 familias de las 36 estudiadas. En 10 de las 16 familias se pudo excluir *ABCA4* como gen responsable de enfermedad. Además en 2 de ellas se identificó un alelo mutado. Hecho que confirma la posible existencia de un elevado número de portadores sanos en nuestra población. Cita de rosa.

Llama la atención el número tan elevado de familias en las que se puede descartar el gen *ABCA4* como responsable de la enfermedad, sugiriendo que este gen desempeña un escaso papel etiopatogénico en la RPAR. Para confirmar esta suposición sería conveniente realizar el análisis de haplotipos al mayor número posible de familias y determinar si cosegregan o no con la enfermedad.

2.2.4- ANÁLISIS DE MARCADORES INTRAGÉNICOS

El propósito de este análisis era determinar, por un lado, asociaciones entre SNPs y mutaciones y por otro lado, el papel de los polimorfismos como factores de protección o riesgo.

Mediante análisis estadísticos, se analizaron por un lado, 128 muestras de pacientes con distintas retinopatías y que presentaban al menos una mutación en el gen *ABCA4* detectada previamente con el microarray de genotipado y, por otro lado, 84 muestras control. De manera que determinamos las mutaciones y los polimorfismos más frecuentes en el grupo de pacientes y controles.

Como era de esperar, la mayoría de mutaciones no se encontraban en el grupo de controles (ver tabla 4.22), excepto para la mutación p.Gly1961Glu que fue detectada en una muestra control (1,19%). Como se ha comentado anteriormente, p.Gly1961Glu era la segunda mutación más frecuente en nuestro grupo de pacientes. Claramente, se observa asociación entre esta mutación y los polimorfismos p.Leu1894Leu, p.Leu1938Leu, p.Pro1948Pro, p.Asp2095Asp y IVS48+21C>T en población española. Sin embargo Fumagalli A *et al.* analizaron los polimorfismos del exón 42 de *ABCA4* y definieron un haplotipo común, en el que p.Gly1961Glu se asocia con tres polimorfismos de único nucleótido (c.5836-43A>C, c.5836-11A>G y p.Pro1948Pro), sugiriendo un origen común a partir de un mismo cromosoma ancestral. Con respecto al polimorfismo IVS48+21C>T, no se detectó en el grupo de controles sugiriendo ser una variante asociada con la enfermedad. Esta asociación también se encontró en población alemana (Rivera A *et al.*, 2000). Por el contrario, los polimorfismos p.His423Arg y p.Asn1868Ile no se encontraban en asociación con la mutación p.Gly1961Glu. Con respecto al polimorfismo p.Asn1868Ile, se han encontrado diferencias significativas

entre el grupo de pacientes y controles (ver tabla 4.23), detectándose mayoritariamente en los pacientes, además los portadores de este polimorfismo presentan un mayor riesgo de padecer la enfermedad (ver tabla 4.25), por lo que esta variante, claramente, se asocia a enfermedad. En otros estudios, la frecuencia del polimorfismo p.Asn1868Ile era mayor en el grupo de controles, sin embargo no se encontraron diferencias significativas (Maugeri A *et al.*, 1999).

La mutación más frecuente era p.Arg1129Leu y se encontraba en asociación con los polimorfismos p.His423Arg y IVS33+48C>T. Sin embargo, las variantes p.Pro1401Pro, p.Asn1868Ile, p.Leu1894Leu y p.Leu1938Leu eran menos frecuentes entre los pacientes portadores de la mutación p.Arg1129Leu. Excepto la variante p.Asn1868Ile, el resto de polimorfismos, tanto los que se encuentran asociados como los que no, presentaban una frecuencia similar entre el grupo de pacientes y controles, pues no se determinaron diferencias significativas (ver tabla 4.23), sugiriendo que no contribuyen a condiciones patológicas.

Con respecto a la tercera mutación encontrada (p.Arg602Trp), se determinó una asociación con el polimorfismo p.Arg943Gln. Sin embargo, en otros estudios de población europea (Rosenberg T *et al.*, 2007; Maugeri A *et al.*, 1999; Webster AR *et al.*, 2001; Papaioannou M *et al.*, 2000) se determinó una clara asociación entre el polimorfismo p.Arg943Gln y la mutación p.Gly863Ala. Este dato confirma la hipótesis de que la población española es genéticamente diferente a otras poblaciones.

La mutación c.3211insGT se encuentra en asociación con los polimorfismos p.His423Arg, p.Asn1868Ile y p.Leu1894Leu. A diferencia del resto de mutaciones es la única que no hemos detectado polimorfismos en asociación negativa.

La variante p.Pro327Pro es una mutación silenciosa que fue descrita por Webster *et al.* en el año 2001. En este estudio, la prevalencia de ésta era muy baja (1.6%) en el grupo de pacientes y no se encontró entre los controles, sugiriendo que se trata de una variante rara que podría modificar el fenotipo.

Excepto las variantes IVS10+5delG, p.Asn1868Ile y IVS48+21C>T, el resto de polimorfismos no presentaban diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el de controles. De modo que, estos cambios no se clasificaron como patogénicos por lo que no contribuyen a lesiones patológicas. Además la mayoría de polimorfismos detectados en población española también fueron encontrados en Estados Unidos y Canada (Webster AR *et al.*, 2001; Briggs CE *et al.*, 2001), en Reino Unido (Papaioannou M *et al.*, 2000) e incluso en población japonesa (Fukui T *et al.*, 2002).

Respecto al polimorfismo p.Asn1868Ile, portadores de dicho cambio presentan un mayor riesgo de padecer la enfermedad, de manera que esta variante podría actuar como un factor de riesgo. Al contrario, los portadores de los polimorfismos p.His423Arg y IVS10+5delG presentan un menor riesgo de padecer la enfermedad, por lo que podrían ser considerados como factores de protección.

Por último, es muy posible que dinucleótidos CG representen puntos calientes, ya que 11 de los 18 (61,1%) polimorfismos más frecuentes se encuentran localizados en dichos puntos, incluida la variante IVS48+21C>T. Sin embargo, los polimorfismos IVS10+5delG y p.Asn1868Ile no se encuentran en dichos puntos. El cambio de nucleótido se puede producir tanto en la citosina como en la guanina y se localizan a lo largo de toda la proteína. Esto explicaría la presencia similar de polimorfismos tanto en nuestra población como en otras poblaciones.

3- IMPLICACIÓN DE ABCA4 EN LA ENFERMEDAD DE STARGARDT Y FENOTIPOS ASOCIADOS

Las tasas de detección de mutaciones en *ABCA4* en población española en STGD, DCB y RPAR son similares a las obtenidas en otras poblaciones, pero es en la Enfermedad de Stargardt y DCB donde éstas desarrollan un papel decisivo.

El estudio molecular del gen *ABCA4* junto con el análisis de haplotipos realizado en pacientes con distintas distrofias de retina ha permitido establecer que las alteraciones en este gen son responsables del fenotipo de STGD y DCB. Sin embargo su implicación en otras retinopatías como RPAR no es tan evidente, de hecho, se ha observado la presencia de alelos mutados que no cosegregan con la enfermedad, hecho que se puede deber a la prevalencia de alelos mutados que existe en población control.

Por otro lado, se han observado familias con RPAR que cosegregan con la enfermedad en las que se han detectado mutaciones. No obstante, es muy poco probable que estas mutaciones sean verdaderamente la causa de la enfermedad, ya que se trata de cambios de aminoácidos a nivel de la proteína y no nulos como se esperaba encontrar. Aunque no podemos descartar que estos cambios puedan ejercer algún efecto modulador o regulador sobre el fenotipo del paciente.

4- CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Es importante y necesario realizar una caracterización genotípica y fenotípica a todos nuestros pacientes para intentar determinar que mutaciones se asocian a cada fenotipo, y de esta manera ofrecer un adecuado consejo genético a nuestros pacientes.

Los pacientes con STGD y DCB en los que se han identificado ambos alelos mutados se han agrupado en función del tipo de alelos que exhiben y de la edad de comienzo de la enfermedad (ver pags. 130-135).

De esta manera, se ha observado que la variante p.Arg1129Leu se encuentra predominantemente asociada a fenotipo STGD (Valverde *et al.*, 2006). Curiosamente, identificamos a una paciente (ARDM-247) doble heterocigoto para los alelos p.Arg1129Leu y p.Cys2137Tyr con fenotipo DCB. Este fenotipo se podría explicar si consideramos la nueva variante p.Cys2137Tyr como un alelo grave que pudiera modificar el fenotipo del paciente. Además, otro paciente que pertenece a la familia ARDM-84 diagnosticado inicialmente de STGD y cuyos síntomas, disminución de la agudeza y del campo visual, escotoma central y fotosensibilidad, comenzaron a la edad de 6 años, presenta esta variante en homocigosis. De manera que, sería recomendable realizar un seguimiento oftalmológico de su enfermedad a largo plazo, considerando la posibilidad de una evolución más grave de la enfermedad.

El paciente de la familia ARDM-198, cuyos síntomas de la enfermedad comienzan a la edad de 7 años, es doble heterocigoto para los alelos p.Arg1129Leu y c.2888delG. Al igual que los pacientes pertenecientes a las familias ARDM-277 y ARDM-283 que exhiben la misma combinación de alelos mutados. El fenotipo hallado, en este caso, es STGD. En estudios

anteriores el alelo c.2888delG se ha asociado a fenotipo DCB (Valverde *et al.*, 2007). De manera que no podemos asegurar que los pacientes que portan la mutación c.2888delG no desarrollen un fenotipo más grave a lo largo de la evolución de la enfermedad.

Un tercer paciente doble heterocigoto para los alelos p.Arg1129Leu y p.Ala1773Val presentaba fenotipo DCB. El alelo p.Ala1773Val se encuentra en la segunda región transmembrana de la proteína. En este caso sería conveniente realizar un estudio funcional para determinar la severidad de esta variante y así determinar si realmente se asocia a DCB.

El cambio p.Gly1961Glu aparece asociado a fenotipo STGD, los pacientes de las familias ARDM-135, ARDM-207 y ARDM-225 presentan un alelo mutado que altera la proteína (c.1029_1030insT, c.4537insC y p.Gln2187X, respectivamente) y la familia ARDM-302 presenta un alelo doble mutado (p.Leu541Pro y p.Ala1038Val), pero sólo el paciente que pertenece a la familia ARDM-207 manifiesta síntomas a los 12 años, en cambio, el inicio de la enfermedad en los otros 3 pacientes comienza a finales de la segunda década en el caso de la familia ARDM-302 y tercera década de vida en el caso de las familias ARDM-135 y ARDM-225, al igual que en la mayoría de casos que presentan el alelo mutado p.Gly1961Glu, por lo que parece tener un efecto moderado como describió (Allikmets *et al.*, 1997), por lo que el desarrollo de la enfermedad debe estar determinado por la patogenicidad del otro alelo.

Los pacientes que presentan en *trans* (doble heterocigoto) alteraciones que generan un codón de parada presentan disminución de la agudeza visual entre la primera y segunda década de vida. Este hecho no difiere de aquellos pacientes que portan alelos mutados menos severos o considerados de efecto moderado, ya que el comienzo de los síntomas se

produce en torno a la misma edad. Excepto para 2 pacientes que presentan el cambio p.Glu328X, cuya edad de inicio de la enfermedad es muy temprana.

En este grupo identificamos a 2 pacientes de las familias ARDM-336 y RP-998, ambos con alelos nulos, que presentan fenotipo DCB. Podemos observar (Tabla 4.27) que el paciente de la familia ARDM-307, cuyos síntomas de la enfermedad comienzan a la edad de 6 años fue diagnosticado de STGD. No obstante presenta 2 alelos nulos (p.Tyr1400X y IVS35+2T>C), por lo que sería conveniente realizar un seguimiento oftalmológico por su posible evolución a DCB.

En los pacientes que portan un alelo doble se observa un desarrollo temprano de la enfermedad. La mayoría de los portadores del alelo doble (p.Ser1642Arg y p.VVAIC1681del) fueron diagnosticados de STGD, excepto el paciente de la familia ARDM-206 que fue diagnosticado de DCB.

Curiosamente este doble alelo mutado solo se ha identificado en población española.

En los pacientes que poseen un alelo mutado que produce un cambio en la pauta de lectura también se observa, en general, un comienzo temprano de la enfermedad. Aquellos pacientes que poseen la variante c.3211insGT combinada con otro alelo en *trans* (doble heterocigoto) manifiestan síntomas a los 8-9 años de edad. Dos de ellos fue diagnosticado de DCB, por lo que sería recomendable un seguimiento oftalmológico a los demás pacientes que presentan la variante c.3211insGT en combinación con otro alelo mutado. Esta mutación ha sido descrita en anteriores estudios. Paloma *et al.*, describió un caso de DCB, doble heterocigoto para los alelos c.3211insGT y p.Arg212Cys, mostrando síntomas a la edad de 9 años. En otro estudio, Rozet *et al.* reportó 2

pacientes con STGD, dobles heterocigotos para el cambio c.3211insGT y para otra variante no mencionada, cuyo comienzo de enfermedad era antes de los 12 años. Por el contrario, en otro trabajo realizado por Briggs *et al.*, 2 pacientes con STGD, en los que tan sólo se identificó la variante c.3211insGT, presentaban una agudeza visual central reducida antes de los 30 años. Lo mismo ocurre en 3 de nuestros pacientes que presentan síntomas de la enfermedad en la tercera década de vida y en los que no ha sido posible la identificación del segundo alelo mutado. Hecho que nos lleva a pensar, que la segunda mutación, aún no detectada, debe ser de efecto moderado. Aunque en los pacientes de las familias ARDM-257 y ARDM-167 se identificó una segunda mutación, ésta estaba localizada en *cis*.

Se ha identificado un alelo (5917delG) que aparece en homocigosis en dos familias (ARDM-295 y RP-741) de origen del este europeo. En ambas la enfermedad comienza en la primera década de vida (7-8 años de edad). Esta variante fue descrita anteriormente por Webster *et al.*, en dicho estudio un paciente STGD presentaba el alelo mutado 5917delG en heterocigosis. En otros estudios (Briggs *et al.*, 2001; Rivera *et al.*, 2000; Gerth C *et al.*, 2002) detectaron el alelo mutado en homocigosis en un paciente diagnosticado de DCB, al igual que en el paciente de la familia RP-741. Por lo que sería conveniente el seguimiento oftalmológico de la familia ARDM-295 por su posible evolución de la enfermedad a DCB.

Los pacientes que exhiben mutaciones que alteran los sitios donadores/aceptores del procesamiento de intrones manifiestan síntomas de la enfermedad a una edad muy variable.

En el caso del paciente de la familia RP-1126, se han identificado ambos alelos mutados IVS26+1G>A y p.Trp2110X. Este paciente fue diagnosticado de DCB, manifestando síntomas de la enfermedad en la

primera década de vida. Las alteraciones que presenta se consideran severas por lo que producen un fenotipo más grave. Briggs *et al.*, ya detectaron el cambio IVS26+1G>A en un paciente con DCB en combinación con otro alelo mutado.

Respecto a la variante IVS28+5G>A, un estudio anterior (Rivera *et al.* 2000) confirmó que se trataba de una mutación asociada a enfermedad. Esta mutación se ha encontrado en las familias ARDM-245 y ARDM-318, ambas diagnosticadas de STGD. Se observa (Ver tabla 4.30) la diferencia extrema que existe en la edad de inicio de la enfermedad en las 2 familias. Hecho que nos lleva a pensar, que la segunda mutación, aún no detectada, debe ser la que determina dicha diferencia.

5- DISEÑO DE UN ALGORITMO DIAGNÓSTICO

A continuación, se muestra el diagrama de flujo propuesto para el estudio genético de la Enfermedad de Stargardt y otras formas asociadas a mutaciones en el gen ABCA4, compatibles con una herencia autosómica recesiva.

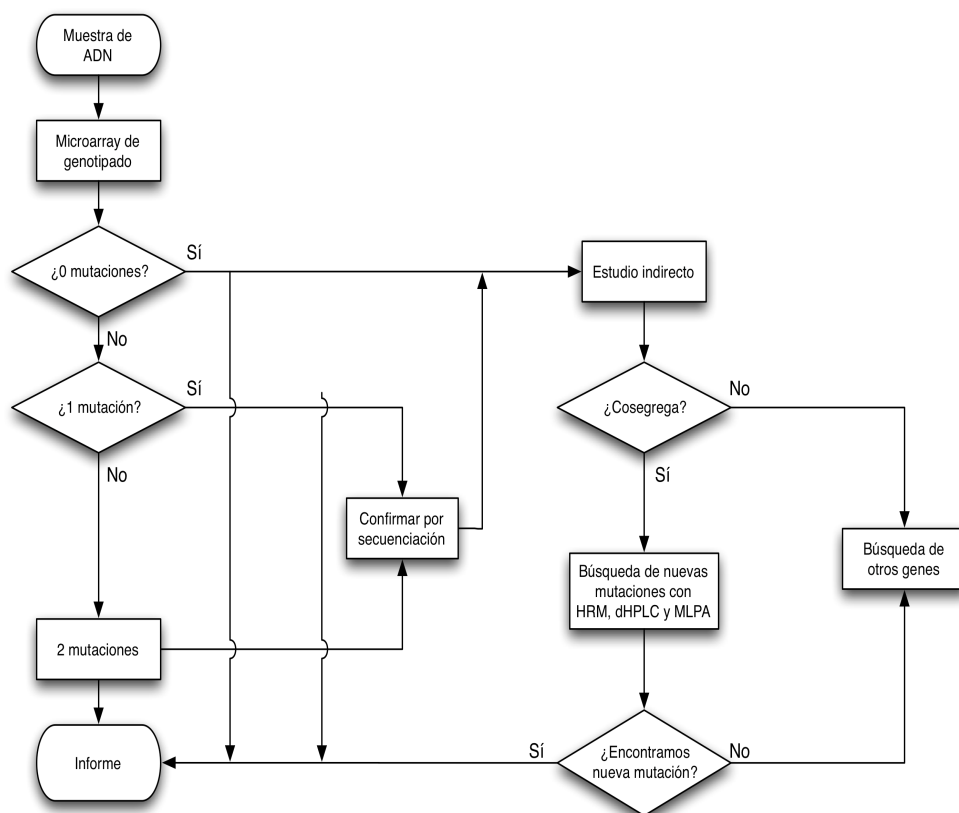


Figura 5.1. Diagrama de flujo para el diagnóstico de STGD, DCB y RPAR.

VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1- El microarray de genotipado ABCR400 (Asperbio) es una buena herramienta para la búsqueda de mutaciones ya descritas en pacientes con patología asociada al gen *ABCA4*. Es una técnica fiable y eficaz cuya tasa de detección es de 54,5% de alelos mutados en 65,4% de pacientes con STGD y algo menor, 36,1% de alelos mutados en 44,4% de pacientes con DCB. En el fenotipo RPAR, la baja tasa de detección de mutaciones (8,1%) puede deberse a la existencia de otros genes responsables (heterogeneidad genética).

2- En aquellos pacientes en los que se ha identificado un alelo mutado en *ABCA4* o no se han identificado mutaciones, la aplicación de otros métodos de cribado (dHPLC y HRM) para la búsqueda de nuevas mutaciones aumenta la tasa de detección.

3- La técnica de HRM es más sensible (95%) y posee un mayor poder de resolución que el dHPLC (80%), de esta manera el HRM se convierte en una técnica esencial para la detección de nuevas mutaciones en el gen *ABCA4*.

4- La técnica de MLPA no detectó ni duplicaciones ni deleciones de gran tamaño en el gen *ABCA4*, por lo que este tipo de mutaciones no son una causa frecuente de enfermedad en población española.

5- La implicación de *ABCA4* en STGD y en DCB es evidente. Sin embargo, su participación en el fenotipo RPAR no es tan claro y la presencia de mutaciones en estos pacientes puede deberse a una asociación fortuita.

6- El Algoritmo diagnóstico elaborado es el más eficaz para la caracterización molecular de los pacientes con STGD, DCB y RPAR.

7- El espectro de mutaciones identificadas en *ABCA4* sugiere que la población española es genéticamente diferente a otras poblaciones descritas (europea, americana, sudafricana y japonesa).

8- La aplicación de técnicas indirectas permite excluir *ABCA4* como gen causante de enfermedad, incluso con un alelo mutado identificado, sugiriendo la existencia de otro gen responsable.

9- La mayoría de polimorfismos identificados en pacientes y controles presentan frecuencias alélicas similares, indicando un origen reciente de los alelos mutados detectados en pacientes.

10- La combinación de dos alelos mutados considerados nulos se asocia a fenotipo de DCB, sin embargo la combinación de un alelo mutado nulo y otro considerado moderado se asocia a fenotipo de STGD.

VII. Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

A

Aaberg TM. Stargardt's disease and fundus flavimaculatus: evaluation of morphologic progression and intrafamilial co-existence. *Trans Am Ophthalmol Soc.*1986;84:453-487.

Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, Peiffer A, Zabriskie NA, Li Y, Hutchinson A, Dean M, Lupski JR, Leppert M. Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* 1997; 277(5333): 1805-1807.

Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A, Gerrard B, Baird L, Stauffer D, Peiffer A, Rattner A, Smallwood P, Li Y, Anderson KL, Lewis RA, Nathans J, Leppert M, Dean M, Lupski JR. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet.* 1997a;15:236-246.

Allikmets R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet.*1997b;17(1):122.

Alloca M, Doria M, Petrillo M *et al.* Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice. *J Clin Invest* 2008;118(5):1955-64

Azarian SM, Travis GH. The photoreceptor rim protein is an ABC transporter encoded by the gene for recessive Stargardt's disease (ABCR). *FEBS Lett.* 1997;409(2):247- 252.

B

Birch DG, Anderson JL, Fish GE. Yearly rates of rod and cone functional loss in retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy. *Ophthalmology* 1999;106:258-268.

Blacharski PA. Fundus flavimaculatus. Newsome DA, ed. *Retinal Dystrophies and Degenerations*. New York: Raven Press 1988;135-159.

Boycott BB, Hopkins JM, Sperling HG. Cone connections of the horizontal cells of the rhesus monkey's retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1987;229:345-379.

Briggs CE, Rucinski D, Rosenfeld PJ, Hirose T, Berson EL, Dryja TP. Mutations in ABCR (ABCA4) in patients with Stargardt macular degeneration or cone-rod degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2229-2236.

C

Carter BJ Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther* 2005;16:541–550.

Chou LS, Lyon E, Wittwer CT. A comparison of High-Resolution Melting Analysis with denaturing High-Performance Liquid Chromatography for Mutation Scanning: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene as a model. *Am J Clin Pathol* 2005;124:330-338.

Connell GJ, Molday RS. Molecular cloning, primary structure and orientation of the vertebrate photoreceptor cell protein peripherin in the rod outer segment disk membrane. *Biochemistry* 1990;29:4691-4698.

Cremers FP, van de Pol DJ, van Driel M, den Hollander AI, van Haren FJ, Knoers NV, Tijmes N, Bergen AA, Rohrschneider K, Blankenagel A, Pinckers AJ, Deutman AF, Hoyng CB. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet* 1998; 7(3):355-362.

Cuenca N, Pinilla I, Sauve Y, Lu B, Wang S, Lund RD. Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cones pathways of p23h transgenic rat retina. *Neuroscience* 2004;127:301-317.

Cuenca N, Pinilla I, Sauve Y, Lund R. Early changes in synaptic connectivity following photoreceptor degeneration in RCS rats. *Eur J Neurosci* 2005;127:301-317.

D

Deamen FJM. Vertebrate rod outer segment membranes. *Biochem Biophys Acta* 1973;300:255-288.

Dharmaraj N, Reddy A, Kiran V, Mandal A, Panicker S, Chakrabarti S. PAX6 gene mutations and genotype-phenotype correlations in sporadic cases of aniridia from India. *Ophthalmic Genet* 2003;24(3):161-165.

E

Eldred GE and Lasky MR. Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents. *Nature* 1993;361(6414):724-726.

EsRetNet. *La Retinosis Pigmentaria en España: estudio clínico y genético*. 1ª edición. 2001.

F

Farrar G. Jane , Kenna Paul F. and Humphries Peter . On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *The EMBO Journal* 2002;21:857-864.

Field LL, Tobias R, Robinson WP, Paisey R, Bain S. Maternal uniparental disomy of chromosome 1 with no apparent phenotypic effects. *Am J Hum Genet* 1998;63(4):1216-1220.

Franceschetti A, Francois J. Fundus flavimaculatus. *Arch Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol* 1965;25(6):505-530.

Fumagalli A, Ferrari M, Soriani N, Gessi A, Foglieni B, Martina E, Manitto MP, Brancato R, Dean M, Allikmets R, Cremonesi L. Mutational scanning of the ABCR gene with double-gradient denaturing-gradient gel electrophoresis (DG-DGGE) in Italian Stargardt disease patients. *Hum Genet* 2001;109(3):326-338.

Fukui T, Yamamoto S, Nakano K et al. ABCA4 Gene Mutations in Japanese Patients with Stargardt Disease and Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2819-2824.

G

Gerth C, Andrassi-Darida M, Bock M, Preising MN, Weber BH, Lorenz B. Phenotypes of 16 Stargardt macular dystrophy/fundus flavimaculatus patients with known ABCA4 mutations and evaluation of genotype-phenotype correlation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002;240:628-638.

Graw J. The genetic and molecular basis of congenital eye defects. *Nat Rev Genet* 2003;4(11):876-888. Review.

Gudrun HR, Wittwer CT. Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. *Clin Chem* 2004;50:1748-1754.

H

Haw AW. *Tratado de Histología*. 6ª Edición. Nueva Editorial Interamericana. México. 1970.

J

Jaakson K, Zernant J, Kulm M, Hutchinson A, Tonisson N, Glavac D, Ravnik-Glavac M, Hawlina M, Meltzer MR, Caruso RC, Testa F, Maugeri A, Hoyng CB, Gouras P, Simonelli F, Lewis RA, Lupski JR, Cremers FP, Allikmets R. Genotyping microarray (gene chip) for the ABCR (ABCA4) gene. *Hum Mutat* 2003;22(5):395-403.

Johnson GJ, Minassian DC, Weale RA, West SK (eds). *The Epidemiology of Eye Disease*. (Oxford Univ. Press. New York, 2003).

Jones MH and Nakamura Y. Somatic mutations at CA-repeat loci. *Hum Mutat* 1992;1:224-228.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histología básica*. 3ª Ed. Salvat Editores, Barcelona, 1987.

K

Kaplan J, Gerber S, Larget-Piet D, Rozet JM, Dollfus H, Dufier JL, Odent S, Postel-Vinay A, Janin N, Briard ML, Frezal J, Munnich A. A gene for Stargardt's disease (fundus flavimaculatus) maps to the short arm of chromosome 1. *Nat Genet* 1994;6(2): 214.

Klevering BJ, Maugeri A, Wagner A, Go SL, Vink C, Cremers FPM, Hoyng CB. Three families displaying the combination of Stargardt's disease with cone-rod dystrophy or retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 2004;111:546-553.

Klevering BJ, Yzer S, Rohrschneider K, Zonneveld M, Allikmets R, van den Born LI, Maugeri A, Hoyng CB, Cremers FPM. Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 (ABCR) gene in autosomal recessive cone-rod dystrophy and retinitis pigmentosa. *Eur J Hum Genet* 2004;12:1024-1032.

Kniazeva M, Chiang MF, Morgan B, Anduze AL, Zack DJ, Han M, Zhang K. A new locus for autosomal dominant stargardt-like disease maps to chromosome 4. *Am J Hum Genet*. 1999;64(5):1394-1399.

Kong J, Kim SR, Binley K *et al.* Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy. *Gene Ther* 2008;15(19):1311-20

Krstic RV. *Human Microscopy Anatomy. An atlas for students of Medicine and Biology.* Springer-Verlag. 1997.

L

Lennie P, Travarthen D, van Essen D, Wässle H. Parallel processing of visual information. En Spillmann; L. & Werner; JS. *Visual perception: the neurophysiological foundations.* Academic; San Diego; CA; 1990.

Lewis RA, Shroyer NF, Singh N, Allikmets R, Hutchinson A, Li Y, Lupski JR, Leppert M, Dean M. Genotype/Phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. *Am J Hum Genet* 1999;64:422-434.

Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer CT. Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphism by High-Resolution Melting of small amplicons. *Clin Chem* 2004;50:1156-1164

Lorenz B, Preising MN. Age matters-thoughts on a grading system for ABCA4 mutations. *Graefe's arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:87-89.

Lutsenko E and Bhagwat AS. Principal causes of hot spots for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells. A model, its experimental support and implications. *Mutat Res* 1999;437(1):11-20.

M

MacDonald IM, Chen MH, Addison D, Mielke BW, Nesslinger NJ. Histopathology of the retinal pigment epithelium of a female carrier of choroideremia. *Can J Ophthalmol* 1997;32:329-333.

Maeda T, Maeda A, Matosky M *et al.* Evaluation of potential therapies for a Mouse model of human age-related macular degeneration caused by delayed all-trans-retinal clearance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009

Maia-Lopes S, Aguirre-Lamban J, Castelo-Branco M *et al.* ABCA4 mutations in Portuguese Stargardt patients: identification of new mutations and their phenotypic analysis. *Mol Vision* 2009;15:584-591.

Martinez-Mir A, Paloma E, Allikmets R, Ayuso C, del Rio T, Dean M, Vilageliu L, Gonzalez-Duarte R, Balcells S. Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat Genet* 1998;18(1):11-12.

Marmor MF, Zrenner E. Standard for clinical electro-oculography. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Arch Ophthalmol* 1993;111(5):601-604.

Marmor MF, Zrenner E. Standard for clinical electroretinography. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Doc Ophthalmol* 1998-1999;97(2):143-156.

Mata NL Tzekov RT, Liu X, Weng J, Birch DG, Travis GH. Delayed dark-adaptation and lipofuscin accumulation in abcr +/- mice: implications for involvement of ABCR in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1685-90.

Maugeri A, van Driel MA, van de Pol DJ, Klevering BJ, van Haren FJ, Tijmes N, Bergen AA, Rohrschneider K, Blankenagel A, Pinckers AJ, Dahl N, Brunner HG, Deutman AF, Hoyng CB, Cremers FP. The 2588G>C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease. *Am J Hum Genet.* 1999;64(4):1024-1035.

Maugeri A, Flothmann K, Hemmrich N, Ingvas S, Jorge P, Paloma E, Patel R, Rozet JM, Tammur J, Testa F, Balcells S, Bird AC, Brunner HG, Hoyng CB, Metspalu A, Simonelli F, Allikmets R, Bhattacharya SS, D'Urso M, Gonzalez-Duarte R, Kaplan J, te Meerman GJ, Santos R, Schwartz M, Van Camp G, Wadelius C, Weber BH, Cremers FP. The ABCA4 2588G>C Stargardt mutation: single origin and increasing

frequency from South-West to North-East Europe. *Eur J Hum Genet* 2002;10(3):197-203.

Merbs SL, Nathans J. Absorption spectra of human cone pigments. *Nature* 1992; 356(6368):433-435.

Milam AH, Li ZY, Fariss RN. Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 1998;17(2):175-205. Review.

Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon- Mateeva R, Macek M Jr, Kalaydjieva L, Angelicheva D, Dancheva R, Romeo G, Russo MP, Garnerone S, Restagno G, Ferrari M, Magnani C, Claustres M, Desgeorges M, Schwartz M, Schwarz M, Dallapiccola B, Novelli G, Ferec C, de Arce M, Nemeti M, Kere J, Anvret M, Dahl N, Kadasi L. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 1994;7(2):169- 175.

Mullis K, Ferre F, Gibbs R: *PCR: The Polymerase chain reaction*. Birkhäuser, Boston, 1994.

P

Paloma E, Martinez-Mir A, Vilageliu L, Gonzalez-Duarte R, Balcells S. Spectrum of ABCA4 (ABCR) gene mutations in Spanish patients with

autosomal recessive macular dystrophies. *Hum Mutat* 2001;17(6):504-510.

Papaioannou M, Ocaka L, Bessant D, Lois N, Bird A, Payne A, Bhattacharya S. An analysis of ABCR mutations in British patients with recessive retinal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(1):16-9.

R

Rawson JD. Bioquímica. Interamericana McGraw-Hill, Madrid, 1989.

Riveiro-Alvarez R, Aguirre-Lamban J, Lopez-Martinez MA, Trujillo-Tiebas MJ, Cantalapiedra D, Vallespin E, Avila-Fernandez A, Ramos C, Ayuso C. Frequency of ABCA4 mutations in 278 Spanish controls: an insight into the prevalence of autosomal recessive Stargardt disease (arSTGD). *Br J Ophthalmol* 2008 Oct 31. *Pendiente de paginación*.

Rivera A, White K, Stohr H, Steiner K, Hemmrich N, Grimm T, Jurklics B, Lorenz B, Scholl HPN, Apfelstedt-Sylla E, Weber BHF. A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 2000;67:800-813.

Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet* 2002;11(10):1219-1227. Review.

Rosenberg T, Klie F, Garred P, Schwartz M. N965S is a common ABCA4 variant in Stargardt-related retinopathies in the Danish population. *Mol Vision* 2007;13:1962-9.

Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, et al. Mutations of the retinal specific ATP binding transporter gene (ABCR) in a single family segregating both autosomal recessive retinitis pigmentosa RP19 and Stargardt disease: evidence of clinical heterogeneity at this locus. *J Med Genet* 1999;36(6):447-51.

S

Schouten JP, McElquinn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30(12):e57.

Shroyer NF, Lewis RA, Lupski JR. Complex inheritance of ABCR mutations in Stargardt disease: linkage disequilibrium, complex alleles, and pseudodominance. *Hum Genet* 2000;106(2):244-248.

Shroyer NF, Lewis RA, Yatsenko AN, Wensel TG, Lupski JR. Cosegregation and functional analysis of mutant ABCR (ABCA4) alleles in families that manifest both Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2001;10:2671-2678.

Simonelli F, Testa F, de Crecchio G, Rinaldi E, Hutchinson A, Atkinson A, Dean M, D'Urso M, Allikmets R. New ABCR mutations and clinical phenotype in Italian patients with Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(3):892-897.

Souied EH, Ducrop D, Gerber S *et al.* Age-related macular degeneration in grandparents of patients with Stargardt disease: genetic study. *Am J Ophthalmol* 1999;128:173-8.

Stargardt K. Uber familiare, progressive degeneration in der maculagegend des auges. *Graefes Arch Ophthalmol.* 1909; 71: 534-550.

Stefkova J, Poledne J, Hubacek JA. ATP-Binding Cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* 2004;53:235-243.

Stenirri S, Fermo I, Battistella S, Galbiati S, Soriani N, Paroni R, Manitto MP, Martina E, Brancato R, Allikmets R, Ferrari M, Cremonesi L. Denaturing HPLC profiling of the ABCA4 gene for reliable detection of allelic variations. *Clin Chem* 2004;50(8):1336-1343.

Stockman A, Sharpe LT, Merbs, Nathans J. Spectral sensitivities of human cone visual pigments determined in vivo and in vitro. *Methods Enzymol* 2000;316:626-650.

Stone EM, Nichols BE, Kimura AE, Weingeist TA, Drack A, Sheffield VC
Clinical features of a Stargardt-like dominant progressive macular dystrophy with genetic linkage to chromosome 6q. *Arch Ophthalmol* 1994;112:765-772.

Sun H, Molday RS, Nathans J. Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J Biol Chem* 1999;274:8269-8281.

Sun H, Smallwood PH, Nathans J. Biochemical defects in ABCR protein variants associated with human retinopathies. *Nat Genet* 2000;26(2):242-246.

T

Travis GH. Insights from a lost visual pigment. *Nat Genet* 1997;15:115-117.

V

Valverde D, Riveiro-Alvarez R, Bernal S *et al.* Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 gene in Spanish patients with Stargardt disease: evidence of a prevalent mutated allele. *Mol Vis* 2006;12:902-928.

Valverde D, Riveiro-Alvarez R, Aguirre-Lamban J *et al.* Spectrum of the ABCA4 gene mutations implicated in severe retinopathies in Spanish patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(3):985-990.

Vogel, W. Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J* 1999;13Suppl:S77-82. Review.

Vossen Rolf HAM, Aten E, Roos A, Dunnen JT. High-Resolution Melting Analysis (HRMA) More than just Sequence Variant Screening. *Hum Mutat* 2009;30:1-7.

W

Warrington KH Jr. & Herzog RW, Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet* 2006;119:571–603.

Weber JL. *Genome Analysis. Genetic and physical mapping.* (eds Davies KE & Tilghman SM). 1990. Volume 1: 159-181 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

Webster AR, Heon E, Lotery AJ, Vandenburg K, Casavant TL, Oh KT, Beck G, Fishman GA, Lam BL, Levin A, Heckenlively JR, Jacobson SG, Weleber RG, Sheffield VC, Stone EM. An analysis of allelic variation in the ABCA4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(6):1179-1189.

Weisz PB; Keogh RN. *La ciencia de la Biología*. Ediciones Omega; Barcelona, 1987.

Weleber RG, Carr RE, Murphey WH, Sheffield VC, Stone EM. Phenotypic variation including retinitis pigmentosa, pattern dystrophy, and fundus flavimaculatus in a single family with a deletion of codon 153 or 154 of the peripherin/RDS gene. *Arch Ophthalmol* 1993;111(11):1531-1542.

Weng J, Mata NL, Azarian SM, Tzekov RT, Birch DG, Travis GH. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell*. 1999; 98: 13-23.

Wilden U, Hall SW, Kuhn H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:1174-1178.

Wiszniewski W, Zaremba CM, Yatsenko AN, Jamrich M, Wensel TG, Lewis RA, Lupski JR. ABCA4 mutations causing mislocalization are found

frequently in patients with severe retinal dystrophies. *Human Mol Genet* 2005;19:2769-2778.

Wright AF and Jay B. 1994. *Molecular genetics of inherited eye disorders*. Harwood Academic Publishers GmbH.

Y

Yatsenko AN, Shroyer NF, Lewis RA, Lupski JR. Late-onset Stargardt disease is associated with missense mutations that map outside known functional regions of ABCR (ABCA4). *Hum Genet* 2001;108:346-355.

Yatsenko AN, Shroyer NF, Lewis RA, Lupski JR. An ABCA4 Genomic Deletion in Patients with Stargardt Disease. *Hum Genet* 2003;21:636-644.

Yau KW. Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:9-32.

Z

Zhang K, Bither PP, Park R, Donoso LA, Seidman JG, Seidman CE. A dominant Stargardt's macular dystrophy locus maps to chromosome 13q34. *Arch Ophthalmol* 1994;112(6):759-764.

Zhang K, Nguyen TH, Crandall A, Donoso LA. Genetic and molecular studies of macular dystrophies: recent developments. *Surv Ophthalmol* 1995;40(1):51-61. Review.

Zhang Q, Zulfiqar F, Xiao X, Riazuddin SA, Ayyagari R, Sabar F, Caruso R, Sieving PA, Riazuddin S, Hejtmancik JF. Severe autosomal recessive retinitis pigmentosa maps to chromosome 1p13.3-p21.2 between D1S2896 and D1S457 but outside ABCA4. *Hum Genet* 2005;118(3-4):356-365.

Zinn KM, Marmor MF. *The retinal pigment epithelium*. Harvard University Press 1979; pg 521. Cambridge; MA.

VIII. Publicaciones

VIII. PUBLICACIONES

Aguirre-Lamban J, Riveiro-Alvarez R, García-Hoyos M, Cantalapiedra D, Avila-Fernandez A, Villaverde-Montero C, Trujillo-Tiebas MJ, Ramos C, Ayuso C. Comparison of High-Resolution Melting Analysis with denaturing High-Performance Liquid Chromatography for Mutation Scanning in the *ABCA4* gene. 2009

Aguirre-Lamban J, Riveiro-Alvarez R, Maia-Lopes S, Cantalapiedra D, Vallespin E, Avila-Fernandez A, Villaverde-Montero C, Trujillo-Tiebas MJ, Ramos C, Ayuso C. Molecular analysis of the *ABCA4* gene for reliable detection of allelic variations in Spanish patients: identification of 21 novel variants. *Br J Ophthalmol*. 2009 May;93(5):614-21. PMID: 19028736

Maia-Lopes S, **Aguirre-Lamban J**, Castelo-Branco M, Riveiro-Alvarez R, Ayuso C, Silva ED. *ABCA4* mutations in Portuguese Stargardt patients: identification of new mutations and their phenotypic analysis. *Mol Vis*. 2009;15:584-91. PMID: 19365591

Riveiro-Alvarez R, **Aguirre-Lamban J**, Lopez-Martinez MA, Trujillo-Tiebas MJ, Cantalapiedra D, Vallespin E, Avila-Fernandez A, Ramos C, Ayuso C. Frequency of *ABCA4* mutations in 278 Spanish controls: an insight into the prevalence of autosomal recessive Stargardt disease (arSTGD). *Br J Ophthalmol*. 2008 Oct 31. PMID: 18977788

Aguirre-Lamban J, Riveiro-Alvarez R, Cantalapiedra D, Vallespin E, Avila-Fernandez A, Villaverde-Montero C, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: ABCA4. Disease: Macular dystrophy. *Hum Genet.* 2008 Oct;124(3):321. PMID: 18846678

Aguirre-Lamban J, Riveiro-Alvarez R, Cantalapiedra D, Vallespin E, Avila-Fernandez A, Villaverde-Montero C, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. *Gene symbol: ABCA4. Disease: Macular dystrophy. Hum Genet.* 2008 Oct;124(3):319. PMID: 18846675

Aguirre-Lambán J, Riveiro-Alvarez R, Cantalapiedra D, Vallespin E, Avila-Fernandez A, Villaverde-Montero C, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: ABCA4. Disease: Macular dystrophy. *Hum Genet.* 2008 Oct;124(3):314. PMID: 18846660

Riveiro-Alvarez R, Vallespin E, Wilke R, Garcia-Sandoval B, Cantalapiedra D, **Aguirre-Lamban J**, Avila-Fernandez A, Gimenez A, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C.

Molecular analysis of ABCA4 and CRB1 genes in a Spanish family segregating both Stargardt disease and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2008 Feb 4;14:262-7. PMID: 18334942

Aguirre-Lamban J, Riveiro-Alvarez R, Cantalapiedra D, Vallespin E, Avila-Fernandez A, Villaverde-Montero C, Lopez-Martinez MA, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: ABCA4.

Disease: Stargardt disease. *Hum Genet.* 2007 Dec;122(5):548. PMID: 18380025

Aguirre-Lamban J, Riveiro-Alvarez R, Cantalapiedra D, Vallespin E, Villaverde C, Avila-Fernandez A, Lopez-Martinez MA, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C. Gene symbol: ABCA4. Disease: Stargardt disease. Human gene mutations. *Hum Genet.* 2007 Sep;122(2):211. PMID: 18386363

Aguirre-Lamban J, Riveiro-Alvarez R, Cantalapiedra D, Vallespin E, Trujillo-Tiebas MJ, Villaverde C, Ayuso C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: ABCA4. Disease: Stargardt disease. *Hum Genet.* 2007 Jun;121(5):648. PMID: 17879441

Valverde D, Riveiro-Alvarez R, **Aguirre-Lamban J**, Baiget M, Carballo M, Antiñolo G, Millán JM, Garcia Sandoval B, Ayuso C. Spectrum of the ABCA4 gene mutations implicated in severe retinopathies in Spanish patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Mar;48(3):985-90. PMID: 17325136

Riveiro-Alvarez R, Valverde D, Lorda-Sanchez I, Trujillo-Tiebas MJ, Cantalapiedra D, Vallespin E, **Aguirre-Lamban J**, Ramos C, Ayuso C. Partial paternal uniparental disomy (UPD) of chromosome 1 in a patient with Stargardt disease. *Mol Vis.* 2007 Jan 26;13:96-101. PMID: 17277736

IX. Anexos

ANEXOS

1- ANEXO 1: COMUNICACIONES A CONGRESO TIPO PÓSTER

“Further analysis with multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) of the ABCA4 gene in Spanish patients with retinal dystrophies”

Aguirre-Lamban J., Riveiro-Alvarez R., Cantalapiedra D., Garcia-Hoyos M., Avila-Fernandez A., Villaverde-Montero C., Trujillo-Tiebas M.J., Ramos C., Ayuso C.

European Human Genetics Conference 2009.

“Novel mutations found in ABCA4 in Spanish families”

Aguirre-Lamban J., Riveiro-Alvarez R., Cantalapiedra D., Garcia-Hoyos M., Vallespin E., Avila-Fernandez A., Gallego-Merlo J., Lopez-Martinez M., Trujillo-Tiebas M.J., Ramos C., Ayuso C.

European Human Genetics Conference 2008.

“Genotyping microarray for diagnosis in 170 families associated with ABCA4: specificity and sensibility”.

Aguirre-Lamban J., Riveiro-Alvarez R., Cantalapiedra D., Vallespin E., Trujillo-Tiebas M.J., Gallego J., Villaverde-Montero C., Lopez-Martinez M.A., Valverde D., Ayuso C.

Meeting of MC-Gard.eu: Molecular profiling of the genome 2007.

FURTHER ANALYSIS WITH MULTIPLEX LIGATION DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) OF THE ABCA4 GENE IN SPANISH PATIENTS WITH RETINAL DYSTROPHIES

J. Aguirre-Lamban^{1,2}, R. Riveiro-Alvarez^{1,2}, D. Cantalapiedra^{1,2}, M. Garcia-Hoyos^{1,2}, A. Avila-Fernandez^{1,2}, C. Vilaverde-Montero^{1,2}, M.J. Trujillo-Tiebas^{1,2}, C. Ramos^{1,2}, C. Ayuso^{1,2}.

¹Genetics Department Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, SPAIN
²Centro de Investigacion Biomedica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain



INTRODUCTION

ABCA4 mutations have been associated with autosomal recessive Stargardt disease (arSTGD). A few cases with autosomal recessive cone-rod dystrophy (arCRD) and autosomal recessive retinitis pigmentosa (arRP) have also been found to have ABCA4 mutations. Comparative genetic analyses of ABCA4 variation and diagnostics have been complicated by substantial allelic heterogeneity. The objective of this study was to determine whether deletions and duplications in the ABCA4 gene are a frequent cause of retinal dystrophies among Spanish patients.

SUBJECTS and METHODS

We analyzed a total of 55 unrelated families. Mutation analysis was performed in 40 arSTGD families, 6 arCRD families and 9 arRP families. DNA samples from patients were previously studied with the ABCR400 genotyping microarray. Patients with either none or only one mutant allele were analysed with multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). Sequencing was employed for the study of 50 control samples.

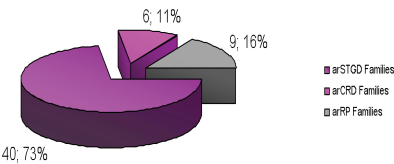


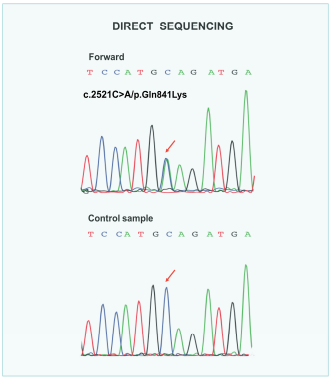
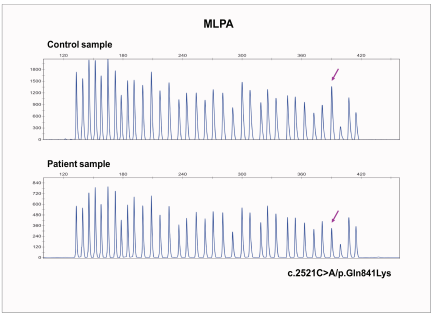
Figure 1. Distribution of the 55 families analyzed

Table 1. Distribution of ABCA4 mutations detected by ABCR400 microarray in STGD, arCRD and arRP patients with either none or only one mutant allele.

| Diagnosis | N° Fam | +/- | +/+ (wt) | Mutated Alleles (Frequency) |
|-----------|--------|-----|----------|-----------------------------|
| arSTGD | 40 | 17 | 23 | 17/80(21.3%) |
| arCRD | 6 | 3 | 3 | 3/12(25%) |
| arRP | 9 | 4 | 5 | 4/18(22.3%) |
| TOTAL | 55 | 24 | 31 | 24/110(21.8%) |

RESULTS

MLPA allowed us to find one novel mutation in heterozygosis (c.2521C>A/p.Gln841Lys) in exon 16 of the ABCA4 gene. This variant was located in the target site of the probe. Thus, a lower peak was shown in the pattern of peaks of the MLPA. The p.Gln841Lys mutation was not found in 100 control chromosomes. Neither deletions nor duplications were found.



CONCLUSIONS

MLPA was mainly designed to detect deletions and duplications of one or more exons of the ABCA4 gene. However, these types of mutations are not a frequent cause of these retinopathies in Spanish population. Therefore, this technique is not suitable for routine use in the molecular diagnosis of the conditions associated with the ABCA4 gene. Nevertheless, this technique enabled us to additionally detect point mutations.

Acknowledgements
EviGenoret:
LSHG-CT-2005-512036
Jana Aguirre-Lamban is supported by The Ministry of Health, Institute of Health Carlos III (Reference PI06/0027)



NOVEL MUTATIONS FOUND IN ABCA4 IN SPANISH FAMILIES

J. Aguirre-Lamban^{1,2}, R. Riveiro-Alvarez^{1,2}, D. Cantalapiedra^{1,2}, M. Garcia-Hoyos^{1,2}, E. Vallespin^{1,2}, A. Avila-Fernandez^{1,2}, J. Gallego-Merlío^{1,2}, M.A. Lopez-Martinez^{1,2}, M.J. Trujillo-Tiebas^{1,2}, C. Ramos^{1,2}, C. Ayuso^{1,2}



¹Genetics Department Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, SPAIN

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain



FUNDACIÓN
Jiménez Díaz

Capio



GENOTYPING MICROARRAY FOR DIAGNOSIS IN 170 FAMILIES ASSOCIATED WITH ABCA4: SPECIFICITY AND SENSIBILITY



Aguirre-Lamban J., Riveiro-Alvarez R., Cantalapiedra D., Vallespin E., Trujillo-Tiebas M.J., Gallego J., Villaverde-Montero C., Lopez-Martinez M.A., Valverde D*, Ayuso C.

Genetics Department Fundación Jimenez Diaz // Madrid //SPAIN
*Biology Department University of Vigo// Vigo//SPAIN
Email: jaguirre@fdj.es

INTRODUCTION
Mutations in the ABCR (ABCA4) gene have been associated with Stargardt disease (STGD) or fundus flavimaculatus (FFM). In addition, a few cases with autosomal recessive cone-rod dystrophy (arCRD) and autosomal recessive retinitis pigmentosa (arRP) have been found to have ABCA4 mutations. Comparative genetic analyses of ABCR variation and diagnostics have been complicated by substantial allelic heterogeneity.

PATIENTS AND METHODS
We analyzed a total of 170 unrelated families. Mutation analysis was performed in 107 STGD families, 32 arCRD families and 31 arRP families. Patient and relatives DNA was analyzed with a commercial microarray, ABCR400 (AsperBio). The results were confirmed by direct sequencing. Haplotype analyses were also performed. In 9 families with only one mutant allele or no mutant allele, we have employed denaturing HPLC (dHPLC) for the detection of not previously reported sequence alterations.

RESULTS
Using the microarray, the respective frequencies of mutant alleles for the 50 exons are: 54.7% (117/214) for STGD with 73 mutated families (44 with two mutant allele and 29 with only one mutant allele), 25% (16/64) for arCRD with 10 mutated families (6 with two mutant allele and 4 with only one mutant allele) and 8% (5/62) for arRP with 5 mutated families (all with only one mutant allele). All the 88 mutated families (138 mutated alleles) were re-sequencing. However in 3 STGD families, the microarray detected a mutant allele which was not confirmed by direct sequencing, giving us a specificity rate of the microarray of 92.3% (36/39). The microarray was able to detect 138 mutant allele, however could not detect 2 other mutations (in 2 STGD families) by dHPLC and/or by direct sequencing. Therefore, the microarray sensibility obtain in this study was 98.5% (135/137). The Positive Predictive Value (PPV) was 97.8% (135/138) and the Negative Predictive Value (NPV) was 94.7% (36/38).

CONCLUSIONS
The ABCR400 genotyping microarray is a comprehensive screening tool for genetic variation in patients with ABCR-associated retinal pathology. The present study suggests the combination of microarray and dHPLC as an optimal screening strategy for mutation analysis in this huge gene.

Microarray Reliability

- Sensibility = 98.5%
- Specificity = 92.3%
- PPV = 97.8%
- NPV = 94.7%

Table 2. Chip Results. Three false positives.

| | Exon | Nucleotide change | Aminoacide change |
|---------------------------|------|-------------------|-------------------|
| 1 st STGD Fam. | 46 | G6320C // G6320A | R2107P // R2107C |
| 2 nd STGD Fam. | 46 | G6320A // G6320C | R2107C // R2107P |
| 3 rd STGD Fam. | 42 | G5882A | G1961E |

Table 3. Chip Results. Two false negatives.

| | Exon | Nucleotide change | Aminoacide change |
|---------------------------|------|-------------------|-------------------|
| 4 th STGD Fam. | 13 | C1804T | R602W |
| 5 th STGD Fam. | 29 | G4297A | V1433I |

Acknowledgements:

EviGenet:

LSHG-CT-2005-512036

Jana Aguirre-Lamban is supported by The Ministry of Health, Institute of Health Carlos III (Reference PI06/0027)

Thanks to Dra. Silvia Vázquez, Susana Maia Lopes and Almudena Avila

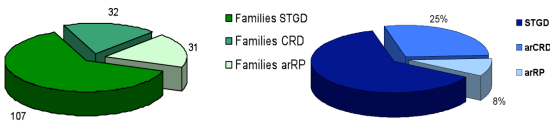


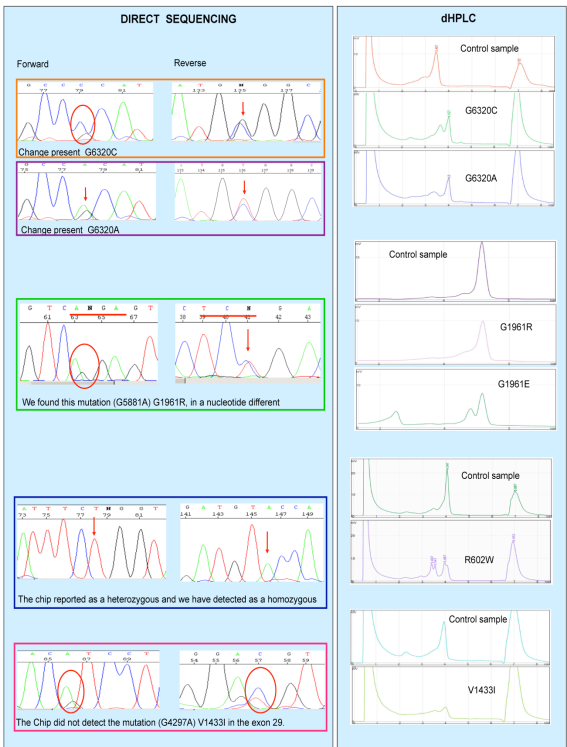
Figure 1. Distribution of the 170 families analyzed.

Figure 2. Frequencies of mutant allele.

Table 1. Distribution of ABCA4 mutations detected by microarray in STGD, arCRD and arRP.

| Diagnosis | N° Fam | -/- | +/- | +/+ (wt) | Mutated Alleles (Frequency) | Mutated Families (Frequency) |
|-----------|--------|-----|-----|----------|-----------------------------|------------------------------|
| STGD | 107 | 44 | 29 | 34 | 117/214 (54.7%) | 73/107(68%) |
| arCRD | 32 | 6 | 4 | 22 | 16/64 (25%) | 10/32 (31%) |
| arRP | 31 | 0 | 5 | 26 | 5/62 (8%) | 5/31 (16%) |
| TOTAL | 170 | 50 | 38 | 82 | 138/340 (40.6%) | 88/170 (52%) |

+, allele normal



2- ANEXO II:

CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES



HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

Proyecto: **Distrofias de Retina (DR) y Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)**

Investigador Principal: **Dra. Carmen AYUSO García**

Por favor, lea con atención este documento y formule las preguntas que quiera. Conserve esta Hoja de Información por si quisiera consultarla de nuevo en el futuro.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las distrofias de Retina (DR) hereditarias son enfermedades genéticas que provocan ceguera y discapacidad.

El Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz pertenece al grupo de investigación internacional EVI-Genoret (<http://www.evi-genoret.org/>) que se dedica al estudio de las enfermedades de la retina: DR y DMAE. El Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz participa en esta investigación realizando los estudios genéticos que permitirán conocer mejor el posible papel de los genes relacionados con su enfermedad.

Su colaboración puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre estas enfermedades. Los resultados contribuirán de forma global a conocer sus causas, mejorar la información a las familias afectadas y a posibilitar una prevención, diagnóstico y tratamiento más rápido y eficaz disminuyendo la frecuencia y gravedad de las mismas.

2. DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

El procedimiento a seguir será el habitual para el diagnóstico y el consejo genético, solicitados por Vd., su familiar o su médico, para la evaluación clínica de la enfermedad:

A) Una consulta para recoger sus antecedentes personales y familiares, si no disponemos de ellos.

B) La obtención de una muestra biológica (de 5 a 15 ml de sangre venosa o el cepillado del interior de la mejilla para la obtención de células bucales).



HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

Proyecto: **Distrofias de Retina (DR) y Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)**

Investigador Principal: **Dra. Carmen AYUSO García**

2.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS

A partir de las muestras biológicas, se extraerá el material genético necesario para el estudio (ADN y/o ARN (Ácido Ribonucleico)) y/o se cultivarán los linfocitos (células existentes en la sangre) para la obtención de cromosomas.

Nosotros protegeremos la confidencialidad de las muestras asignándoles un código específico. Su muestra solo será identificada a través del código que la ligará a usted. La decodificación solo podrá ser llevada a cabo por el investigador principal o la persona autorizada por él.

1.- Una pequeña parte de este material se utilizará para el análisis diagnóstico de los genes en estudio, relacionados con las DR.

Si Vd. acepta solo los estudios genéticos descritos en este punto, su muestra se destruirá después de completar las pruebas.

2.- Es probable que en un futuro se descubran más genes que puedan estar también involucrados en el desarrollo de estas enfermedades. Por ello se le solicita que autorice al Investigador a almacenar su muestra para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en un futuro.

Si autoriza el almacenamiento, la muestra codificada se guardará de forma adecuada durante un periodo de hasta 15 años, en nuestro banco de ADN, en la Fundación Jiménez Díaz Capiro.

3.- Vd. debe decidir el destino que debemos dar a su muestra al término de esta investigación (puntos 1 y 2) y comunicárnoslo mediante el Consentimiento Informado.

Su muestra podría ser destruida, ser anonimizada (perderá los identificadores que la ligan a Vd. y por tanto no podrá ser localizada ni destruida) o ser almacenada hasta su posible incorporación a un nuevo estudio, para lo que necesariamente nuestro equipo tendría que ponerse en contacto con Vd., informarle y solicitarle un nuevo consentimiento.



HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

Proyecto: **Distrofias de Retina (DR) y Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)**

Investigador Principal: **Dra. Carmen AYUSO García**

3. BENEFICIOS QUE SE ESPERAN ALCANZAR

La información que se produzca podría ser útil para su salud y la de su familia. Nosotros también esperamos que los resultados obtenidos nos permitan ampliar nuestros conocimientos en las enfermedades de base genética y posiblemente contribuir al beneficio de la sociedad en general.

Tiene Vd. derecho a conocer los resultados genéticos individuales y/o generales confirmados que se obtengan del análisis de las muestras donadas y las repercusiones clínicas conocidas que ello conlleva.

4. RIESGOS

Aun cuando la toma de la muestra de sangre no cause problemas serios para la mayoría de la gente, ésta puede ocasionar un poco de sangrado, magulladura, desvanecimiento, vértigo, infección y/o molestia en el sitio de la inyección.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud, derivada de los análisis genéticos que se realicen sobre su muestra biológica.

En ese caso se le entregaría un informe genético específico, explicándole la implicación clínica que tiene la alteración genética identificada, en una consulta especial llamada de "Consejo Genético".

Vd. debe advertir a los investigadores en caso de NO QUERER ser informado.

La información obtenida podría tener consecuencias para sus familiares. En ese caso sería conveniente que Vd. mismo les transmitiera dicha información.



HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

Proyecto: **Distrofias de Retina (DR) y Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)**

Investigador Principal: **Dra. Carmen AYUSO García**

5. CONFIDENCIALIDAD Y DERECHOS DE ACCESO Y RECTIFICACIÓN

Toda la información (datos personales, clínicos, genéticos, etc.) será recogida y tratada de forma estrictamente confidencial por todo el personal y, respetará en todo momento lo establecido por la legislación aplicable y regulaciones vigentes en materia de, protección de datos de carácter personal y principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas. (Entre otras: Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente, Ley 14/1986 General de Sanidad y Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.)

Únicamente el código permitirá a los investigadores responsables de la Fundación Jiménez Díaz hacer corresponder las muestras biológicas y los datos con las personas participantes.

Estos datos formarán parte de un fichero automatizado y/o manual cuya finalidad es la de gestionar su historia clínica y que estará ubicado en la Fundación Jiménez Díaz. El responsable del fichero es la Dirección Médica de la Fundación Jiménez Díaz con domicilio en la Avda/ Reyes Católicos nº 2 Madrid (28040), dónde podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición que en aplicación de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos legalmente le asisten.

Ninguno de sus datos personales será transferido, únicamente algunos de los datos clínicos, codificados y sin ninguna identificación personal serán introducidos en una base de datos europea restringida a la que solo los investigadores de EVI-GENORET (miembros de países de la UE, descritos en <http://www.evi-genoret.org/>) pueden acceder.

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniendo una estricta confidencialidad sobre la identidad de los pacientes.



HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

Proyecto: **Distrofias de Retina (DR) y Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)**

Investigador Principal: **Dra. Carmen AYUSO García**

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Su participación en este estudio es completamente libre y voluntaria. Vd. puede decidir no participar y, estará en libertad de retirarse del estudio en cualquier momento. Para ello deberá contactar con algún miembro del equipo investigador e indicar su decisión acerca del destino de sus muestras/datos personales.

Tómese el tiempo necesario para reflexionar sobre su decisión y discuta su participación en el proyecto con personas cercanas a Vd. antes de darnos su respuesta.

Le comunicamos que su decisión, sea cual sea, no afectará a su atención médica o la de sus familiares.

Teniendo en cuenta que el estudio utiliza muestras para el estudio de genes, se respetarán los principios de la Declaración de Helsinki, los contenidos de la Declaración Universal de la UNESCO, y la ratificación del Convenio para la Protección de los Derechos Humanos y la Dignidad del Ser Humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina; BOE n. 251 de 20/10/1999).

Si se dispone de nueva información que pueda ser relevante para su decisión de participar en el estudio, Vd. será informado.

7. FUENTE DE FINANCIACIÓN

El presente proyecto está financiado con fondos del Ministerio de Sanidad español (ISCIII) y de la Unión Europea. (Evi-Genoret Integrated Project LSHG-CT-2005-512036).

Ni los investigadores ni los participantes en el estudio percibirán remuneración económica alguna por su participación.



HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

Proyecto: **Distrofias de Retina (DR) y Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)**

Investigador Principal: **Dra. Carmen AYUSO García**

Tal como exige la ley, para participar deberá firmar y fechar el documento de Consentimiento Informado anexo.

Proporciona la información y este consentimiento:

Yo,.....en calidad de:

(Nombre y Apellidos)

(Marque con una X lo que proceda)

☐ Participante

☐ Testigo del consentimiento oral de

(Nombre y Apellidos del participante)

☐ Representante legal,de

Relación con el participante (Nombre y Apellidos del participante)

declaro bajo mi responsabilidad que:

He/ha recibido una copia de la Hoja de Información al Participante y una copia firmada de este Consentimiento Informado.

He/ha leído la Hoja de Información que se me/le ha entregado sobre el estudio.

He/ha podido hacer preguntas sobre el estudio, he/ha recibido suficiente información sobre el estudio y la he/ha comprendido.

Comprendo/e que la participación es voluntaria.

He/ha tenido tiempo para reflexionar sobre mi/su decisión antes de dar el consentimiento.

Comprendo/e que puedo/e retirarme/se del estudio:



HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE

Proyecto: **Distrofias de Retina (DR) y Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE)**

Investigador Principal: **Dra. Carmen AYUSO García**

- 1) Cuando quiera.
- 2) Sin tener que dar explicaciones.
- 3) Sin que esto repercuta en mis/sus cuidados médicos.

Presto/a libremente mi/su conformidad para que:

(Marque con una X la parte del estudio a la que dé consentimiento):

Punto 1.- ☐ se pueda realizar el análisis diagnóstico en relación con las Distrofias de Retina en mi/su muestra de ADN.

Punto 2.- ☐ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 15 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con las Distrofias de Retina.

Punto 3.- ☐ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en la base de datos europea de acceso restringido para los investigadores de EVI-GENORET y colaboradores.

Punto 4.- ☐ SI / ☐ NO deseo/a ser informado/a.

Punto 5. – al término de esta investigación, mis/sus muestras:

☐ sean almacenadas hasta que decida, por medio de un nuevo Consentimiento Informado, su inclusión en un nuevo proyecto.

☐ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas. ☐ sean destruidas. .

En, a.....de.....de.....

Firma del participante, testigo

o representante legal

Firma del investigador